



Stem-Kit Reagents

REF IM3630 50 tests

TABLE OF CONTENTS

English	2
Français (FR)	14
Deutsch (DE)	27
Italiano (IT)	40
Español (ES)	53
Português Portugal (PT-PT)	66
Dansk (DA)	79
Svenska (SV)	91
Norsk (NO)	103
Ελληνικά (EL)	115
Magyar (HU)	129
Polski (PL)	142
Čeština (CZ)	155
Türkçe (TR)	168
Русский (RU)	180
eesti keel (ET)	195
Română (RO)	207
Latviešu (LV)	220
Українська (UK)	232
Português Brasil (PT-BR)	246
APPENDIX	259
REFERENCES	271

Stem-Kit Reagents

REF IM3630 50 tests

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

Stem-Kit Reagents consist of a two-color fluorescent (FITC, PE) murine monoclonal antibody reagent, a two-color murine fluorescent (FITC, PE) isoclonic control, an absolute count reagent, a cell viability reagent, and a lysing reagent. It is intended "For In Vitro Diagnostic Use" for the simultaneous identification and enumeration of CD45+ and dual-positive CD45+ CD34+ cell population percentages and absolute counts in biological specimens by flow cytometry. Biological specimens include fresh normal or mobilized peripheral whole blood, and fresh or thawed apheresis products, cord blood and bone marrow. Cell population measurements may be obtained using either an automated method or a manual method for gating and analysis.

Refer to this Stem-Kit Reagents package insert for complete instructions if using the manual method. Refer to the stemCXP System Guide provided with the stemCXP 2.0 software kit and stemCXP version 2.0, WIN 7 for complete instructions if using the automated method.

SUMMARY

Hematopoietic Progenitor Cells (HPC)

The Stem-Kit Reagents are designed to identify the human hematopoietic progenitor cells (HPC) using the following criteria: "True CD34+ cells (a) express CD34 antigen, (b) express CD45 antigen with staining intensity characteristic of blast cells (i.e., readily detectable but at lower levels than lymphocytes and monocytes), and (c) exhibit low side-angle and low to intermediate forward angle light scatter characteristics of blast cells" (1). Exclusion of dead CD34+ HPC from viable CD34+ HPC enumeration is achieved using the 7-AAD Viability Dye (2).

CD34

The CD34 antigen is a family of differentially glycosylated type I transmembrane single chain glycoproteins (3, 4, 5). It is expressed on virtually all hematopoietic precursor cells including multipotent stem cells. CD34 epitopes have been separated into three classes based upon sensitivity to neuraminidase and to *Pasteurella haemolytica* glycoprotease (6). The CD34 monoclonal antibody (mAb) used in Stem-Kit Reagents is named 581. It specifically recognizes a class III epitope of the CD34 molecule (7) as defined by enzymatic cleavage patterns (6, 8). This 581 monoclonal antibody was assigned to CD34 during the 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens in Boston, Massachusetts, USA, in 1993 (7).

CD45

The CD45 antibody recognizes members of the CD45 family of pan leukocyte antigens with molecular weights of 180, 190, 210, and 220 kD (9, 10, 11). It is also known as the leukocyte common antigen (LCA). CD45 antigen is expressed on every type of hematopoietic cell except mature erythrocytes and their immediate progenitors (11, 12). It has not been detected in differentiated nonhematopoietic tissue (12, 13, 14, 15). The CD45 mAb used in Stem-Kit Reagents is named J33. It was assigned to CD45 during the 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens in Oxford, England, in 1986 (16).

7-AAD

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) Viability Dye is an analog of actinomycin D that contains a substituted amino group at the 7 position of the chromophore. 7-AAD Viability Dye intercalates between cytosine and guanine bases of the DNA (15). Actinomycins are biologically active compounds containing a 2-amino-4, 6 dimethylphenoxazine-3 chromophore and two cyclic pentapeptides (17). Actinomycins form stable complexes with double-stranded deoxyribonucleic acid (DNA) but neither with double-stranded ribonucleic acid (RNA), nor with RNA-DNA hybrids or with single-stranded DNA or RNA (15, 18).

The spectral properties of 7-AAD Viability Dye make this molecule particularly suitable for flow cytometry analysis (17). The maximum absorption of the 7-AAD / DNA complex is situated in the green spectral region and thus is suitable for an argon laser equipped-cytometer (excitation wavelength of 488 nm) (15). The deep red fluorescence emission of 7-AAD Viability Dye (635 to 675 nm) makes the use of this probe easier in combination with fluorescein isothiocyanate (FITC) and phycoerythrin (PE) conjugated antibodies because, in contrast to propidium iodide (PI), the 7-AAD / DNA complex shows minimal spectral overlap with FITC and PE (17).

Apoptotic, necrotic cells, and / or damaged cells are sources of interference in the analysis of viable cells by flow cytometry. Nonviable cells shall be evaluated and discriminated by focusing on 7-AAD-positive staining when viable cells remain unstained (negative) (19).

Flow Cytometer Systems

Flow cytometer systems (FC500) apply the principles of flow cytometry to analyze biological specimens in order to identify various cell populations determined by the specific monoclonal antibodies and fluorochromes used. The present test uses the FC500 flow cytometer systems equipped with CXP System Software to analyze samples.

PRINCIPLE

This test depends on the ability of a monoclonal antibody to bind to the surface of cells expressing discrete antigenic determinants. The CD45-FITC / CD34-PE reagent in Stem-Kit Reagents is a combination of two murine monoclonal antibodies; each conjugated to a specific fluorochrome and specific for a different cell surface antigen. Specific cell surface staining is accomplished by incubating duplicate samples of a biological specimen with the two-color CD45-FITC / CD34-PE reagent.

An additional test of the same sample is stained with the CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagent to check the non-specific binding of the CD34-PE monoclonal antibody. 7-AAD Viability Dye, a nucleic acid dye that binds to accessible base pairs (cellular DNA), is used to distinguish between viable and nonviable cells. The red blood cells in each sample are lysed with NH₄Cl Lysing Solution prepared at 1X. Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres (the absolute count reagent) are added, and the remaining cells analyzed by flow cytometry. Process control and quality control, for the assay, are provided by the instrument and sample quality control reagents: Flow-Check Fluorospheres, Flow-Set Fluorospheres, appropriate compensation reagents, and Stem-Trol Control Cells.

EXAMPLES OF CLINICAL APPLICATIONS

A chronology of hematopoietic progenitor cells (HPC) scientific reports shows early studies relied upon nucleated cell counts for quantification. Subsequent studies involving colony forming unit (CFU) assays provided rough approximations of progenitor cell populations. The time intensive CFU assays were followed by the discovery of the CD34 cell surface molecule. CD34 was found to be present on the surface of early hematopoietic cells and hematopoietic colony-forming cells in bone marrow and peripheral blood (20). Monoclonal antibodies directed against the CD34 molecule were then developed and utilized in flow cytometry. CD34 determinations by flow cytometry are now widely accepted as a means to assess hematopoietic progenitor and stem cells.

In bone marrow of normal individuals, 1 to 3% of the cells expressing the CD34 antigen are capable of reconstituting long-term multi-lineage hematopoiesis (3, 20). In peripheral blood of normal individuals, less than 0.1% of circulating cells express the CD34 antigen (1, 21). The use of Stem-Kit reagents provides a simple, rapid, and sensitive flow cytometric method to enumerate hematopoietic progenitor and stem cells in peripheral blood, leukopheresis products, bone marrow, and cord blood.

REAGENT CONTENTS

Stem-Kit Reagents contain the following:

- CD45-FITC / CD34-PE Reagent (45/34) – 1 vial.
- CD45-FITC / IsoClonic Control-PE Reagent (45/CTRL) – 1 vial.
- Stem-Count Fluorospheres – 1 vial.
- 7-AAD Viability Dye – 1 vial.
- 10X NH₄Cl Lysing Solution – 2 vials.

1. These reagents must be used as a set as supplied in the kit.

Flow-Count Fluorospheres, which are equivalent to Stem-Count Fluorospheres, can be used for the absolute count determination if using the specific assayed concentration.

2. The CD45-FITC / CD34-PE is a ready-to-use two-color reagent provided in 2.2 mL of phosphate-buffered saline (PBS) containing 2 mg/mL bovine serum albumin (BSA) and 0.1% sodium azide as a preservative.
3. The CD45-FITC / IsoClonic Control-PE is a ready-to-use two-color reagent provided in 1.2 mL of PBS containing 2 mg/mL BSA and 0.1% sodium azide as a preservative. The CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagent is a mixture of unconjugated and PE-conjugated (CD34 identical) 581 monoclonal antibody. This mixture acts as an appropriate, isomorphologic control to check the nonspecific binding of the CD34-PE mAb on each and every sample.

NOTE: The CD45-FITC / CD34-PE and the CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagents are not to be separated. When the tests and the controls are performed, care should be taken that both reagents have the same lot number on the vial label.

Summary of antibodies characteristics

Specificity	CD45	CD34
Clone	J33	581
Hybridoma	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig Chain	IgG1, κ light chains	IgG1, κ light chains
Species	Mouse	Mouse
Conjugation	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
Molar ratio	5 – 8 moles FITC / mole Ig	0.5 – 1.5 moles PE / mole Ig

Specificity	CD45	CD34
Excitation wavelength	488 nM (blue-green)	488 nM (blue-green)
Fluorescence emission	504 to 541 nm (mainly green)	568 to 590 nm (mainly orange)

- The Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres consist of 10 µm (nominal diameter) polystyrene fluorescent microspheres in a 20 mL aqueous suspension medium, containing a surfactant and 1% formaldehyde. Each fluorosphere contains a dye that has a fluorescence emission range of 525 nm to 700 nm when excited at 488 nm. The Stem-Count Fluorospheres, or Flow-Count fluorospheres, assayed concentration (fluorospheres / µL) is derived from multiple replicate analyses using a COULTER particle size analyzer. The lot specific value is stated on the vial label.
- The 7-AAD Viability Dye is provided in 99% phosphate-buffered saline (PBS: 0.01 M sodium phosphate, 0.145 M sodium chloride, pH 7.2), with 1% dimethyl sulfoxide (DMSO).
- The NH₄Cl Lysing Solution is provided as a 10X concentrated, 20 mL solution. It contains a mixture of ammonium chloride (NH₄Cl), potassium bicarbonate (KHCO₂), Disodium Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA).

WARNING AND PRECAUTIONS

- Monoclonal antibody preparations contain 0.1% sodium azide. Sodium azide, under acidic conditions, yields hydrazoic acid, an extremely toxic compound. Disposal into sewage systems should be accompanied with large quantities of running water to avoid dangerous buildup in metal piping and potential explosions.
- Specimens, samples and all material coming in contact with them should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.
- Never pipet by mouth and avoid contact of samples or reagents with skin and mucous membranes.
- Do not use reagents beyond the expiration dated on the vial label.
- Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres contain 1% formaldehyde. Avoid contact with skin and eyes as formaldehyde may cause irreversible effects to these tissues. Do not breathe vapors. Wear appropriate safety equipment such as gloves and eye protection.
- Do not expose Stem-Kit Reagents to strong light or to heat during storage or use.
- Avoid evaporation and leakage of Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres, or erroneous results may occur. Tightly cap the vials after use and store upright.
- Ensure the fluorospheres are completely resuspended before use. Avoid excessive mixing to minimize the formation of air bubbles. Do not pipet air bubbles or erroneous results may occur.
- Use a calibrated pipet (positive displacement or repeater pipets, preferred) for dispensing samples and Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres, or erroneous results may occur.
- Use pipetting techniques recommended by the pipet manufacturer to ensure accurate and precise pipetting of samples and Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres, or erroneous results may occur.
- Stained and lysed samples must be stored on ice and analyzed on the flow cytometer according to the information in section "Processed Sample stability" otherwise erroneous results can occur.
- Ensure that at least 1,000 Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres are counted, or the automatic conversion of results to absolute counts will not occur.
- Each lot of Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres has a specific concentration of fluorospheres. Ensure the correct assayed concentration is used when determining absolute count results.
- Preparation methods requiring a wash step should not be used due to an unknown loss of cells.
- The use of incubation or mixing times, or temperatures other than those specified, may give erroneous results.
- 7-AAD Viability Dye contains 0.005% 7-AAD. Pure 7-AAD is a potential carcinogen. Although this compound is highly diluted, we recommend to avoid contact with skin and eyes, to wear suitable protective clothing and gloves and appropriate eye / face protection.
- 7-AAD Viability Dye contains 1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Pure DMSO is an irritant. Although this compound is diluted, we recommend avoiding contact with skin and eyes, to wear suitable protective clothing and gloves, and appropriate eye / face protection.
- As a chromophore, 7-AAD is sensitive to light. Store the 7-AAD Viability Dye within the kit's cardboard packaging container to avoid continuous exposure to light during storage.
- Minimize exposure of mixed samples to light during incubation.
- Use general good laboratory practices when handling reagents.

GHS HAZARD CLASSIFICATION

Stem-Count Fluorospheres

DANGER



H316

Causes mild skin irritation.

H317

May cause an allergic skin reaction.

H350

May cause cancer.

P201

Obtain special instructions before use.

P280

Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.

P308+P313

IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.

P333+P313

If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364

Take off contaminated clothing and wash it before use.

Formaldehyde 0.5 - 1.0%

reaction mass of:

5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin

-3-one [EC# 247-500-7] and

2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) < 0.05%

7-AAD Viability Dye

WARNING

H316

Causes mild skin irritation.

P332+P313

If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

Dimethyl Sulfoxide 0.5 - 2%



Safety Data Sheet is available at beckman.com/techdocs

STORAGE CONDITIONS AND STABILITY

The unopened reagent is stable until the expiration date stated on the vial when stored at 2 – 8°C in the absence of light. Do not use after the expiration date. Do not freeze. The Stem-Kit Reagents are stable for 30 days after opening of Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres vial. Opened vials must be recapped immediately after use and stored at 2 – 8°C in the absence of light. Do NOT aliquot Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres from its original vial.

IMPORTANT: Risk of erroneous results if leakage of the Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres occurs. Once opened Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres must be stored in an upright position to prevent the possibility of leakage. Reagents should not be used if signs of leakage are observed.

Evidence of Deterioration

Evidence of deterioration may occur in the following situations:

Stem-Kit Reagents, except Stem-Count Fluorospheres

- A change in normal appearance as listed below

Reagent	Normal Appearance
CD45-FITC / CD34-PE	Clear, slightly pink liquid
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Clear to slightly pink liquid
7-AAD Viability Dye	Clear, slightly pink to reddish liquid
NH ₄ CL Lysing Solution	Clear, colorless liquid

Stem-Count Fluorospheres

- The appearance, during acquisition, of secondary fluorescent populations containing more than 20% of the total population of fluorospheres.
- A major variation in values obtained for counts or samples.

IMPORTANT: Reagents should not be used if there is evidence of deterioration because incorrect results could be obtained. Call your local Beckman Coulter Representative if there is evidence of deterioration.

Reagent Preparation

1. The CD45-FITC / CD34-PE and CD45-FITC / IsoClonic Control-PE two-color reagents are used directly from the vials without any dilution.
2. Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres are used directly from the vial without any dilution. All of the aluminum from the heat seal must be removed from the top of the bottle when first opened. Proper mixings are required. When first handling the Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres vial at the beginning of the day, vortex for 3 – 5 seconds.

Before pipetting from the vial, gently agitate by 3 – 5 vial inversions.

After initial vortexing at the beginning of the day, return the fluorospheres vial to 2 – 8°C until use.

Avoid evaporation and leakage by tightly capping vial after use.

3. 7-AAD Viability Dye is used directly from the vial without any dilution.
4. A 1X NH₄Cl Lysing Solution must be prepared daily: add nine volumes of deionized water to one volume of 10X concentrated NH₄Cl Lysing Solution. Do not refrigerate. Discard the unused 1X NH₄Cl Lysing Solution at the end of the day.

Bring all reagents to room temperature (18 – 25°C) prior to use.

SPECIMEN HANDLING

Specimen Requirements

Specimens handling summary:

Specimen Type	Gating Method	Storage Temperature	Specimen Age
Apheresis	Algorithm	2-8°C	24 Hours
	Manual	2-8°C	24 Hours
Bone Marrow	Algorithm	2-8°C	24 Hours
	Manual	2-8°C	24 Hours
Cord Blood	Algorithm	18-25°C	24 Hours
	Manual	18-25°C	24 Hours
Normal Whole Blood	Algorithm	18-25°C	20 hours
	Manual	18-25°C	20 hours
Mobilized Whole Blood	Algorithm	18-25°C	20 hours
	Manual	18-25°C	20 hours

1. Biological specimens include fresh, normal or mobilized peripheral whole blood, and fresh or thawed apheresis products, cord blood and bone marrow.
2. Manipulated or purified hematopoietic progenitor cells (HPC) can only be analyzed with the manual gating method.
3. Collect apheresis products, peripheral blood specimens, cord blood specimens or bone marrow specimens aseptically into a sterile evacuated blood collection tube with ACD formula A or K3 EDTA anticoagulant.
4. Whole blood and mobilized whole blood specimens collected in anticoagulant tubes can be stored for up to 20 hours at room temperature (18-25 °C) before staining.
5. Cord blood specimens collected in anticoagulant tubes can be stored for up to 24 hours at room temperature (18-25 °C) before staining.
6. Collected Apheresis products and Bone Marrow specimens can be stored for up to 24 hours at 2-8 °C before staining.
7. Prior to sample preparation, ensure that the white blood cell (WBC) concentration is no greater than 30 x 10⁹ WBC cells / L. If necessary, dilute the sample with HBSS or equivalent to reach an average value of 15 x 10⁹ WBC cells / L. Record the dilution factor for the calculation of the final HPC absolute count.
8. Low protein concentrations may lead to Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres clumping and give erroneously high absolute cell counts. Dilution of specimens with a low protein concentration must be performed using a protein-enriched buffer.
9. All specimens should be processed with Stem-Kit Reagents including the 7-AAD Viability Dye.

Procedure for Specimen Processing

Perform tests in duplicate, following “ The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry ” (1).

NOTE: For Stem-Trol Control Cells processing, please refer to the Stem-Trol Control Cells package insert for complete instructions, if using the manual method. Refer to the stemONE System Guide provided with the stemONE System Software or stemCXP System Guide provided with stemCXP System Software for complete instructions, if using the automated analysis method.

1. For each specimen sample, label three tubes as follows:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
 2. Pipet 20 µL of CD45-FITC / CD34-PE Reagent into tubes: 45/34/7-AAD #1 and 45/34/7-AAD #2.
 3. Pipet 20 µL of CD45-FITC / IsoClonic Control-PE Reagent into the tube: 45/CTRL/7-AAD.
 4. Pipet 20 µL of 7-AAD Viability Dye into all tubes.
- IMPORTANT:** Risk of incomplete lysis if blood specimen remains on the top or side of the test tube. Use care when pipetting to prevent the blood from touching the top or side of the test tube. Clean the tube with a cotton swab, if necessary, to remove all traces of blood specimen from the top or side of the test tube.
5. Using a positive displacement pipet or repeater pipet, pipet 100 µL of the patient sample into the tube.
 6. Immediately vortex the tube for 5 seconds.
 7. Incubate all tubes at room temperature (18 – 25°C) for 20 minutes, protected from light.
 8. After incubation, add 2 mL of prepared 1X NH₄Cl Lysing Solution to each tube and vortex immediately for 5 seconds.

NOTE: For details about preparing the Lysing Solution, see section 7.2 above, entitled REAGENT PREPARATION.

IMPORTANT: Risk of erroneous results if air bubbles are pipetted. Excessive mixing of Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres can create air bubbles. Do not excessively mix the Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres, and do not pipet air bubbles into the sample tubes.

9. Incubate at room temperature for 10 minutes, protected from light.
10. Gently mix the Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres by inverting the vial 3 to 5 times before using.
11. Prior to acquisition, and immediately after step 9 using a positive displacement or repeater pipet, pipet 100 µL of Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres into each of the three tubes.
12. Immediately vortex each tube for 5 seconds.

NOTE: For details about preparing the Lysing Solution, see section 7.2 above, entitled REAGENT PREPARATION.

Specimen Staining Summary

Reagents / Samples	45/34/7-AAD #1	Test Tube Label 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD Viability Dye	20 µL	20 µL	20 µL
Specimen	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex – Incubate at room temperature for 20 minutes. Protect from light.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vortex – Incubate at room temperature for 10 minutes. Protect from light.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex			
For Collected Apheresis products, Cord Blood samples and Bone Marrow samples, do not wait more than 60 minutes on ice prior to acquisition.			
For whole blood and mobilized whole blood samples, do not wait more than 45 minutes on ice prior to acquisition.			

Reagents / Samples	45/34/7-AAD #1	Test Tube Label 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
Analyze the thawed sample immediately.			
Protect from light			

Processed Sample stability:

- For Collected Apheresis products, Cord Blood samples and Bone Marrow samples, after the addition of Stem-Count or Flow-Count fluorospheres do not wait more than 60 minutes on ice prior to acquisition.
- For whole blood and mobilized whole blood samples, after the addition of Stem-Count or Flow-Count fluorospheres do not wait more than 45 minutes on ice prior to acquisition.
- For Frozen sample acquisition should be done immediately after the addition of Stem-Count or Flow-Count fluorospheres.
- Processed samples must be stored on ice protected from light, and limit the RT exposure as much as possible during acquisition.

CONTENTS

Sodium azide preservative may form explosive compounds in metal drain lines. See NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76).

To avoid the possible build-up of azide compounds, flush wastepipes with water after the disposal of undiluted reagent. Sodium azide disposal must be in accordance with appropriate local regulations.

MATERIALS NEEDED BUT NOT SUPPLIED WITH KIT:

1. Deionized water.
2. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) or equivalent
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. As an alternative to Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (Ref. 7547053)
9. Ice water bath
10. Plastic test tubes (12 x 75 mm)
11. Calibrated repeater pipet (20 μ L, 100 μ L, 2 mL) and tips or calibrated positive displacement pipets (20 μ L, 100 μ L, 2 mL) and tips
12. Calibrated standard pipette (20 μ L, 100 μ L, 2 mL) and tips.
13. Vortex mixer.
14. Timer.
15. Flow cytometer.
16. stemCXP 2.0 software kit, stemCXP version 2.0, WIN 7, ONLY for automated analysis of samples on FC500 flow cytometer system equipped with CXP Software (Version 2.0).

RESULTS

Analysis Protocol Setup

The flow cytometer must be equipped to detect forward scatter, side scatter and four fluorescence channels. For the FL3 channel (for Stem-Count or Flow-Count Fluorospheres monitoring) use a 620 nm band pass filter. For the FL4 channel (for 7-AAD Viability Dye monitoring) use a 675 nm long pass filter.

Ensure that the flow cytometer is properly aligned and standardized for fluorescence intensity.

Ensure that the flow cytometer is properly adjusted for fluorescence compensation.

NOTE: For specimen analysis, all region positions are approximate until the end of acquisition of the 45/34/7-AAD #1 tube. Regions are optimized according to the following protocol and then NOT adjusted for the second and third tubes in the panel.

A series of 8 histograms and gating scheme must be followed for specimen analysis (see below). The same series of 8 histograms and gating scheme must be followed when using CD34+ control cells. Regions A, B, C, and D (see the heading "Region Creation" for region definition) shall be adapted to include the CD34+ control cells characteristic cluster.

Histogram Creation

Create histograms as follows:

1. Create Histogram 1 as FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter.
2. Create Histogram 2 as FL2 CD34-PE vs. Side Scatter.
3. Create Histogram 3 as FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter.
4. Create Histogram 4 as Forward Scatter vs. Side Scatter.
5. Create Histogram 5 as FL1 CD45-FITC vs. FL2 CD34-PE.
6. Create Histogram 6 as Forward Scatter vs. Side Scatter.
7. Create Histogram 7 as Time vs. FL3 Stem-Count or Flow-Count Fluorospheres.
8. Create Histogram 8 as FL4 7-AAD Viability Dye vs. Side Scatter.

Histograms 1 to 4 are intended to characterize CD34+ HPC, a process that may be delayed until the analysis step. These first four histograms are set up according to the ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (1, 2). Histograms 5 to 7 are intended to monitor parameters that are of importance during the acquisition step. These include the forward scatter discriminator, the number of CD45+ events to be collected, and the correct fluorosphere singlets accumulation.

Histogram 8 is intended to discriminate and analyze viable events from nonviable events.

Region Creation

Create regions as follows:

1. Histogram 1 – Create a rectilinear Region A on Histogram 1 to include all CD45+ leukocytes and eliminate platelets, red blood cell debris, and aggregates.
2. Histogram 1 – Create an amorphous Region E on Histogram 1 to include the lymphocytes (bright CD45, low side scatter).
3. Histogram 2 – Create a rectilinear Region B on Histogram 2 to include all CD34+ events. Set a stop count of 75,000 events (CD45+ events) for Histogram 2.
4. Histogram 3 – Create an amorphous Region C on Histogram 3 to include all clustered CD45dim events.
5. Histogram 4 – Create an amorphous Region D on Histogram 4 to include all clustered events with intermediate side scatter and intermediate to high forward scatter.
6. Histogram 5 – Create a Quadstat Region I on Histogram 5 to verify the lower limit of CD45 expression on CD34+ events.
7. Histogram 5 – Create an amorphous Region H on Histogram 5 to surround all Stem-Count or Flow-Count Fluorospheres, including doublets. The region H should be located at the top right corner of Histogram 5.

NOTE: Be sure that Region H is drawn as an AMORPHOUS region.

8. Histogram 5 – Create rectilinear Region K (named "listgate –") on Histogram 5. Set Region K boundaries at the first log decade of the two parameter histogram. This Region K allows the elimination of double negative events during the acquisition in order to analyze 75,000 relevant CD45+ events.
9. Histogram 6 – Copy Region D from Histogram 4 as Region F in Histogram 6.
10. Histogram 7 – Create a rectilinear Region G on Histogram 7 to include the Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres singlets only. Region G can be labeled as "CAL" to allow automatic calculation of absolute numbers of CD34+ HPC (refer to the instrument manual for further details).
11. Histogram 8 – Create a rectilinear Region J on Histogram 8 to include viable leukocytes (7-AAD Viability Dye negative events).

Gate Creation

Create gates as follows:

1. Histogram 1 – Assign "J" to Histogram 1 to display all viable events. If 7-AAD is not used assign "-H" region to Histogram 1 to display all events excluding all Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres including doublets.

2. Histogram 2 – Assign “ AJ ” (“ A ” if 7-AAD is not used) to Histogram 2 to display viable (total if 7-AAD is not used) CD34+ events.
3. Histogram 3 – Assign “ A ” and “ B ” and “ J ” (“ A ” and “ B ” if 7-AAD is not used) to Histogram 3 to display all viable (total if 7-AAD is not used) CD45+ / CD34+ events.
4. Histogram 4 – Assign “ A ” and “ B ” and “ C ” and “ J ” (“ A ” and “ B ” and “ C ” if 7-AAD is not used) to Histogram 4 to display viable (total if 7-AAD is not used) CD45+ / CD34+ clustered events with low side scatter while excluding platelets and debris. Events from Region ABCDJ are real viable CD34+HPC.
5. Histogram 5 – Ungated to display all events.
6. Histogram 6 – Assign “ EJ ” (“ E ” if 7-AAD is not used) to Histogram 6 to display viable (total if 7-AAD is not used) lymphocytes as a visual check on the discriminator.
7. Histogram 7 – Assign “ H ” to Histogram 7 to display all Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres including doublets.
8. Histogram 8 – Assign “ A ” to Histogram 8 to display CD45+ events.

Flow Cytometry Setting

1. Verify that the flow cytometer is properly aligned and optimized for light scatter and fluorescence intensities of the FL1, FL2, FL3, and FL4 detectors according to manufacturer's and laboratory guidelines. Verify that color compensation is set for standard operation. Refer to the instrument's manual for further instructions.
2. Vortex test tubes for 5 seconds.
3. Perform data acquisition on the flow cytometer. A minimum of 75,000 CD45+ events must be analyzed.
4. For specimen analysis: Adjust the discriminator and regions by analyzing sample tube 45/34/7-AAD #1. Save the protocol, and analyze the 45/34/7-AAD #2 and the 45/CTRL/7-AAD tubes with no further adjustments.

Analysis Example

The histograms shown in the APPENDIX are displayed in an ascending number order as displayed on the protocol.

Calculation of CD34+ HPC for Specimen

The number of CD34+ HPC is calculated as the average of the region D statistical results for the two replicate samples (i.e. 45/34/7-AAD #1 and 45/34/7-AAD #2).

The CD34+ HPC results are considered valid if the results obtained by the CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagent is less than 10% of the CD34+ HPC results.

1. Average the results obtained from the 45/34/7-AAD #1 and 45/34/7-AAD #2 tubes for each specimen (i.e. average of Region D statistics printout results). The number of CD34+ HPC may fall within 10% of the mean for the duplicate samples. The value obtained with the 45/CTRL/7-AAD control tube must represent less than 10% of the average value obtained from the tests tubes to validate the results

NOTES: If the mean for the absolute count obtained for the duplicate CD34+ HPC falls outside the accepted range (i.e. exceeds 10%), determine whether the pipetting has been correctly performed, especially for the Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres. Visually check the flow cytometer reports and the quality of the staining and lysing processes in your test tubes. Verify the way the region boundaries were set.

If the value obtained with the 45/CTRL/7-AAD falls outside of the range of accepted values (i.e. exceeds 10% of the absolute count mean obtained for the duplicate), determine whether the pipetting has been correctly performed, especially for the Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres. Visually check the flow cytometer reports and the quality of the staining and lysing processes in your test tubes. Verify the way the region boundaries were set.

If necessary, repeat the acquisition step with the addition of a BLANK tube after the first duplicate tube 45/34/7-AAD #1 and #2 and before the 45/CTRL/7-AAD tube. If necessary, repeat the whole preparation with new test tubes adding the BLANK tube. Acquire and analyze both the new and the previous series of tubes. Compare the two results. If there is no agreement, call your local Beckman Coulter Representative.

2. If the sample has been diluted, the result obtained above MUST be multiplied by the appropriate dilution factor (Dil). The final result obtained is the absolute CD34+ HPC count (cells / μ L).

$\text{CD34+ HPC Absolute Count (cells / } \mu\text{L)} = \text{CD34+ HPC Absolute Count Printout Result (cells / } \mu\text{L)} \times \text{Dil}$

3. For apheresis packs, the total number of CD34+ HPC per pack can be calculated from the following formula:

$$\text{CD34+ HPC Total Number per Pack} = \text{CD34+ HPC Absolute Count (cells / } \mu\text{L)} \times 10^6 \times \text{Pack Volume (L)}$$

Where:

4. For percentage of CD34+ HPC within the CD45+ leukocytes value calculation, refer to the following formula :

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{CD34+ HPC Absolute Count (cells / } \mu\text{L)} \text{ (i.e. region D Printout Results)}}{\text{CD45+ Leukocytes Absolute Count (cells / } \mu\text{L)} \text{ (i.e. Region A Printout Results)}} \times 100$$

QUALITY CONTROL

Ensure that the flow cytometer is properly aligned according to the manufacturer's recommendations as listed in the instrument manuals. Target intensities have been established to optimize light scatter and fluorescence instrument settings for analyzing samples stained with the CD45-FITC / CD34-PE monoclonal antibody reagent and CD45-FITC / Isoclonic Control-PE reagent.

The fluorochromes fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), and 7-Amino Actinomycin D dye (7-AAD) emit at different wavelengths, but they do have some spectral overlap that must be corrected by electronic compensation. Optimal compensation levels can be established by analyzing, in a dualparameter histogram, a whole blood sample spiked with Stem-Trol Control Cells stained with the 7-AAD Viability Dye and appropriate compensation reagents when using CXP Software. In this analysis, adjustments are made to ensure that no staining occurs in the dual-color quadrant with any individual fluorochrome.

7-AAD Viability Dye (7-Amino Actinomycin D) is used to identify nonviable cells by flow cytometric analysis to allow enumeration of the viable cells of interest. The dye is taken up by dead cells (bright events) that are then excluded from viable cells (negative events) by gating (see Histogram 8).

Before samples are analyzed, an assayed control (Stem-Trol Control Cells) should be stained to verify antibody reactivity.

PERFORMANCE

The performance characteristics provided are based on Stem-Kit Reagents used with an COULTER EPICS XL/XL-MCL flow cytometer with System II Software. For examples of performance on a FC 500 with CXP Software, please refer to the stemCXP System Guide.

Expected Values for Reference Ranges

Normal whole-blood specimens (n = 117) were collected from a population of males (n = 58) and females (n = 59) to establish a normal reference range. This study was performed at an external evaluation site. Replicate tests for each specimen were prepared according to the Stem-Kit Reagents package insert. Manual gating and analysis was carried out to obtain CD45+, CD34+, and CD34% values.

The statistical analysis suggests a non-Gaussian distribution of the collected data. Based on these findings, a nonparametric (robust) approach was used to analyze the data. CD45+, CD34+, and CD34% values were obtained. Values are expressed in terms of absolute counts (cells / μL) for CD45+ and CD34+ and percentage of the total leukocyte count (CD34%) as shown in the table below.

Normal Whole Blood: Reference Ranges

Manual Method (Robust Analysis)	n	CD45+ (cells / μL)				CD34+ (cells / μL)				CD34+ (%)			
		Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD
Manual	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0.50	6.50	2.36	1.14	0.015	0.600	0.052	0.056

These values are intended to be representative only. Each laboratory should establish its own expected values from the local population of normal donors.

Linearity

Replicate measurements were made at each of 10 serial dilutions for 2 types of samples: CD34+-spiked peripheral whole-blood and fresh mobilized peripheral whole-blood. A dynamic range of 0 to 2,000 cells / μL and a low-end sensitivity range of 0 to 150 cells / μL were achieved for CD34+ HPC concentrations. Samples were prepared according to the Stem-Kit Reagents package insert and analyzed on a COULTER EPICS XL/XL-MCL flow cytometer. Values are expressed as absolute counts (cells / μL). Results were analyzed in terms of linear regression analyses for expected versus recovered absolute counts for the mean of the replicates less endogenous CD34+ cells. See the following tables.

The slopes of the regression lines provided with the plots for total CD34+ HPC absolute counts show the mathematical measure of linearity. This is supported by minimal potential assay bias as evidenced by the y-intercepts for the analyses. Expected absolute counts demonstrate high correlation with the recovered absolute counts.

CD34+ Spiked Whole Blood Results

See Appendix for graph.

Peripheral (Mobilized) Blood Results

See Appendix for graph.

Accuracy of Method (Tables) (Expected vs. Recovered Results)

Accuracy of Method is defined as the degree of agreement between expected and recovered results for both manual and automated gating and analysis methods. Fresh normal peripheral whole blood was spiked with purified CD34+ cells to a level of 1875 cells / μL . Cell counts were confirmed by a Malassez slide hemacytometer and serially diluted to different concentrations. Expected results are compared to recovered results for the mean of duplicate measurements using automated and manual gating and analysis for each dilution level. Testing for slope and ordinates at the intercept demonstrate no statistical difference between the automated gating and analysis and the expected results, nor between the manual gating and analysis and expected results.

Accuracy of Method - CD34+ (%)

See Appendix for graph.

Accuracy of Method - CD34+ Absolute Count (cells / μL)

See Appendix for graph.

Accuracy of Method - Total Leukocytes - CD45+ (cells / μL)

See Appendix for graph.

Accuracy of Method (Automated vs. Manual Results)

The degree of accuracy between the automated and manual methods of the stemONE System was studied at four external evaluation sites using fresh peripheral whole blood and fresh or thawed apheresis, cord blood, and bone marrow specimens. The confidence intervals (CI) were calculated with 95% limits.

Fresh peripheral whole blood (n = 59 from three sites), fresh apheresis products (n = 51 from three sites), fresh cord blood (n = 29 from two sites), fresh bone marrow (n = 33 from two sites), thawed apheresis products (n = 23 from one site), thawed cord blood (n = 31 from two sites), and thawed bone marrow (n = 20 from one site) specimens were prepared according to the Stem-Kit Reagents package insert and analyzed on COULTER EPICS XL/XL-MCL flow cytometers. Automated and manual gating and analysis were carried out to obtain CD45+, CD34+, and CD34% values.

Accuracy of Methods (Figures)

Fresh Peripheral Whole Blood Specimens (n = 59)

See Appendix for graph.

Fresh Apheresis Specimens (n = 51)

See Appendix for graph.

Fresh Cord Blood Specimens (n = 29)

See Appendix for graph.

Fresh Bone Marrow Specimens (n = 33)

See Appendix for graph.

Thawed Apheresis Specimens (n = 23)

See Appendix for graph.

Thawed Cord Blood Specimens (n = 31)

See Appendix for graph.

Thawed Bone Marrow Specimens (n = 20)

See Appendix for graph.

Precision

Interlaboratory Precision

Studies were performed within one clinical facility by three operators, each using a different flow cytometer. Three specimens representing the CD34+ dynamic range (0 – 2000 cells / μL) were identified:

Low range:	fresh, mobilized peripheral blood
Mid range:	apheresis product
High range:	apheresis product

These specimens were split into three aliquots, one aliquot of each level (low, mid, high) was provided to each of the three operators. Samples were prepared (n = 10) from each aliquot according to the Stem-Kit Reagents package insert. Each operator performed analysis on an EPICS XL flow cytometer using automated and manual gating and analysis to obtain CD45+, CD34+, and CD34% values. Values are expressed in terms of percentage (%) of the total leukocyte count and as absolute counts (cells / μ L).

Results of the Interlaboratory Precision Study, by level, are given in the following tables. The values obtained for CD45+ and CD34+ absolute counts and CD34 percentages showed little variation as evidenced by the means, standard deviations, and coefficients of variation for the replicate measurements.

See Appendix for graph.

Intralaboratory Precision

Specimens covering the dynamic range of the assay were obtained by using fresh peripheral whole blood, fresh bone marrow, and fresh and thawed: apheresis and cord blood from four external evaluation sites. Ten samples from each were prepared according to the Stem-Kit reagents package insert and analyzed on COULTER EPICS XL/XL-MCL flow cytometers using manual gating and analysis to obtain CD45+, CD34+, and CD34% values.

The values for CD45+, CD34+, and CD34% given in the next tables demonstrate that the method of analysis is reproducible as evidenced by the means, standard deviations, and coefficients of variation for these measurements. The data tables shown in APPENDIX demonstrate Intralaboratory Precision for the assay.

See Appendix for graph.

LIMITATIONS

Refer to the stemCXP System Guide provided with the stemCXP System Software for limitations when using the automated method.

- Stained and lysed samples must be stored on ice and analyzed on the flow cytometer according to the information in section "Processed Sample stability" otherwise erroneous results can occur.
- Do not dilute, aliquot, or freeze the reagents. Use only as packaged.
- The reagents are for flow cytometry use only.
- Thaw frozen specimens properly to ensure optimal staining.
- All red blood cells may not lyse under the following conditions: presence of nucleated red blood cells, abnormal protein concentration, or hemoglobinopathies. This may cause falsely decreased CD34% results due to unlysed red blood cells being counted as leukocytes. CD34+ and CD45+ absolute counts should not be affected.
- Certain patients may present special problems due to altered or very low numbers of certain cellular populations.
- Results obtained with flow cytometry may be erroneous if the gates are improperly set.
- Stem-Kit Reagents is designed to use 7-AAD Viability Dye to determine HPC viable cells. If your laboratory is using an alternative viability determination method, follow general good laboratory practices and your laboratory's quality control procedures to ensure the quality of the reported results.

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

ADDITIONAL INFORMATION

www.beckmancoulter.com

Symbols Key

Glossary of Symbols is available at beckman.com/techdocs (document number B60062)

Réactifs Stem-Kit

REF IM3630 50 tests

Pour une utilisation en Diagnostic *In Vitro*

UTILISATION

Les réactifs Stem-Kit consistent en un réactif anticorps monoclonal murine bicolore fluorescent (FITC, PE), un contrôle isotonique murine fluorescent bicolore (FITC, PE), un réactif de valeur absolue, un réactif de viabilité cellulaire et un réactif de lyse. Il est destiné à un « usage de diagnostic in vitro » pour l'identification simultanée et l'énumération de CD45+ et le calcul du pourcentage de la population cellulaire doublement positive CD45+ et CD34+ ainsi que les valeurs absolues pour des échantillons biologiques par cytométrie en flux. Les échantillons biologiques consistent en sang total frais normal ou périphérique mobilisé et en produits d'aphérèse frais ou décongelés, en sang de cordon ou en moelle osseuse. La mesure de la population cellulaire peut être obtenue à l'aide d'une méthode automatisée ou d'une méthode manuelle pour le gating et l'analyse.

Se référer à la notice dans le paquet de Stem-Kit Reagents pour les instructions complètes en cas d'analyse manuelle. Référez-vous au stemCXP System Guide (Guide du système stemCXP) fourni avec le kit de logiciels stemCXP 2.0 et le logiciel stemCXP version 2.0, WIN 7 pour consulter les instructions complètes si vous utilisez la méthode d'analyse automatisée.

RÉSUMÉ

Cellules progénitrices hématopoïétiques (HPC)

Les réactifs Stem-Kit sont conçus pour identifier les cellules progénitrices hématopoïétiques (HPC) humaines à l'aide des critères suivants : « Un véritable CD34+ cellules (a) exprime un antigène CD34 antigen, (b) exprime un antigène CD45 avec une intensité de couleur caractéristique des blastes (facilement détectables mais à des niveaux plus bas que les lymphocytes et monocytes) et (c) montre un diffusion latérale faible et une diffusion avant faible à intermédiaire caractéristique des blastes » (1) L'exclusion de CD34+ HPC mortes de l'énumération des CD34+ HPC viables est obtenue à l'aide du marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye (2).

CD34

L'antigène CD34 est une famille de glycoprotéines à chaîne unique transmembrane de type I à glycosylation différentielle (3, 4, 5). Il est exprimé sur virtuellement tous les blastes hématopoïétiques y compris les cellules souches multipotentes. Les épitopes CD34 ont été divisés en trois classes selon leur sensibilité à la neuraminidase et à la glycoprotéase *Pasteurella haemolytica* (6). L'anticorps monoclonal CD34 (mAb) utilisé dans les réactifs Stem-Kit est nommé 581. Il reconnaît spécifiquement l'épitope de classe III de la molécule CD34 (7) comme il est défini dans les modèles de discrimination des enzymes (6, 8). L'anticorps monoclonal 581 a été attribué à CD34 au cours du 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5e Séminaire HDLA, Antigènes de différenciation des leucocytes humains) à Boston dans le Massachusetts aux États-Unis en 1993 (7).

CD45

L'anticorps CD45 reconnaît les membres de la famille CD45 d'antigènes pan-leucocytaire avec des poids moléculaires de 180, 190, 210 et 220 kD (9, 10, 11). Il est aussi connu en tant qu'antigène leucocytaire commun (LCA). L'antigène CD45 est exprimé sur chaque type de cellule hématopoïétique à l'exception des érythrocytes matures et de leurs progénitrices immédiates (11, 12). Il n'a pas été détecté dans des tissus non-hématopoïétique différenciés (12, 13, 14, 15). Le CD45 mAb utilisé dans les réactifs Stem-Kit est appelé J33. Il a été attribué au CD45 au cours du 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3e Séminaire HLDA sur les Antigènes de différenciation des leucocytes humains) à Oxford, en Angleterre, en 1986 (16).

7-AAD

Le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye (7-amino-actinomycine D) est un analogue de l'actinomycine D qui contient un groupe amino de substitution sur la position 7 du chromophore. Le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye s'intercale entre les bases cytosine et guanine de l'ADN (15). Les actinomycines sont des complexes biologiquement actifs contenant un chromophore 2-amino-4, 6 diméthylphénoxazone-3 et deux pentapéptides cycliques (17). Les actinomycines forment des complexes stables avec un ADN à deux brins mais sans acide ribonucléique (ARN) à deux brins ou hybrides ADN-ARN ou ADN ou ARN à un seul brin (15, 18).

Les propriétés spectrales du marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye rendent cette molécule particulièrement appropriée à l'analyse par cytométrie en flux (17). L'absorption maximale du complexe 7-AAD / ADN est située dans la région spectrale et est donc appropriée pour une cytométrie avec laser à argon (onde d'excitation de 488 nm) (15). L'émission fluorescente rouge sombre du marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye (de 635 à 675 nm) rend l'usage de cette sonde plus facile associée aux anticorps conjugués d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et de phycoérythrine (PE) parce que contrairement à l'iodure de propidium (PI) le complexe 7-AAD / ADN montre un chevauchement spectral minimal avec FITC et PE (17).

Les cellules apoptotiques, nécrotiques et/ou endommagées sont des sources d'interférences dans l'analyse des cellules viables par cytométrie en flux. Les cellules non-viables doivent être évaluées et discriminées à l'aide du marquage positif 7-AAD lorsque les cellules viables ne se colorent pas (réaction négative) (19).

Cytomètre en flux

Les systèmes de cytomètres en flux (FC 500) appliquent les principes de la cytométrie pour l'analyse d'échantillons biologiques afin d'identifier des populations de cellules diverses déterminées par les anticorps monoclonaux et les fluorochromes employés. Le présent test utilise les systèmes de cytomètres en flux FC 500 équipés du logiciel système CXP pour analyser des échantillons.

PRINCIPE

Ce test dépend de la capacité d'un anticorps à se lier à la surface des cellules en exprimant des déterminants antigéniques discrets. Le réactif CD45-FITC / CD34-PE dans les réactifs Stem-Kit est une combinaison de deux anticorps monoclonaux murins ; chacun conjugué à un fluorochrome spécifique et spécifique pour chaque antigène de surface cellulaire. La coloration des surfaces des cellules est effectuée en incubant des échantillons dupliqués d'un spécimen biologique avec un réactif bicolore CD45-FITC / CD34-PE.

Un test complémentaire sur le même échantillon est coloré avec le réactif CD45-FITC / IsoClonic Control-PE pour vérifier le lien non-spécifique de l'anticorps monoclonal CD34-PE. Le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye, un marqueur d'acide nucléique qui lie les paires de base (ADN cellulaire) est employé pour distinguer les cellules viables des non-viables. Les globules rouges de chaque échantillon sont lysés avec la solution de lyse NH₄Cl Lysing Solution préparée à 1X. Des fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count (réactif de valeur absolue) sont ajoutées et les cellules restantes sont analysées par cytométrie en flux. Les contrôles de qualité et de procédure pour le test sont fournis par l'instrument et les réactifs de contrôle qualité des échantillons : fluorosphères Flow-Check et Flow-Set, des réactifs de compensation appropriés ainsi que les Stem-Trol Control Cells.

EXEMPLES D'APPLICATIONS CLINIQUES

Une chronologie de comptes-rendus des cellules hématopoïétiques progénitrices (HPC) montre que les premières études reposaient sur la numération des cellules nucléées pour quantification. Les études ultérieures employant des tests d'unité formant colonie (UFC) fournissaient une estimation approximative des populations de cellules progénitrices. Les longs tests UFC ont été suivis par la découverte de la molécule de surface cellulaire CD34. La présence de la CD34 sur la surface des cellules hématopoïétiques précoces et des cellules hématopoïétiques formant colonie dans la moelle osseuse et le sang périphérique (20). Les anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule CD34 ont alors été développés et utilisés dans la cytométrie en flux. La détermination de CD34 par cytométrie en flux est aujourd'hui largement reconnue comme un moyen d'évaluer les cellules hématopoïétiques progénitrices et souches.

Dans la moelle osseuse des individus normaux, 1–3 % des cellules exprimant l'antigène CD34 sont capables de reconstituer une hématopoïèse multi-lignée au long terme (3, 20). Dans le sang périphérique d'individus normaux, moins de 0,1 % des cellules en circulation expriment l'antigène CD34 (1, 21). L'utilisation de réactifs Stem-Kit offre une méthode de cytométrie en flux simple, rapide et sensible pour énumérer les cellules progénitrices et souches hématopoïétiques dans le sang périphérique, les produits de leucophrèse, la moelle osseuse et le sang du cordon.

CONTENU DU RÉACTIF

Les réactifs Stem-Kit contiennent :

- Réactif CD45-FITC / CD34-PE (45/34) — 1 flacon.
- Réactif CD45-FITC / IsoClonic Control-PE (45/CTRL) — 1 flacon.
- Fluorosphères Stem-Count — 1 flacon.
- Marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye — 1 flacon.
- Solution de lyse 10X NH₄Cl — 2 flacons.

1. Ces réactifs doivent être utilisés sous forme de set comme ils sont fournis par le kit.

Les fluorosphères Flow-Count , qui sont équivalentes aux fluorosphères Stem-Count, peuvent être employées pour déterminer la valeur absolue en utilisant la concentration de test spécifique.

2. Le CD45-FITC / CD34-PE est un réactif bicolore prêt à l'emploi présenté dans 2,2 mL de tampon phosphate salin (PBS) contenant 2 mg/mL d'albumine de sérum bovin (ASB) et 0,1 % d'azoture de sodium faisant fonction de conservateur.
3. Le CD45-FITC / IsoClonic Control-PE est un réactif bicolore prêt à l'emploi présenté dans 1,2 mL de tampon phosphate salin (PBS) contenant 2 mg/mL d'albumine de sérum bovin (ASB) et 0,1 % d'azoture de sodium faisant fonction de conservateur. Le réactif CD45-FITC / IsoClonic Control-PE est un mélange d'anticorps 581 sous forme non conjuguée et conjuguée PE (identique au CD34) Ce mélange agit comme un contrôle approprié isomorphologique pour vérifier le lien non-spécifique de CD34-PE mAb sur chacun des échantillons.

REMARQUE: Les réactifs CD45-FITC / CD34-PE et CD45-FITC / IsoClonic Control-PE ne doivent pas être séparés. Lorsque les tests et les contrôles sont effectués, veiller à ce que les deux réactifs ont bien le même numéro de lot sur l'étiquette du flacon.

Récapitulatif des caractéristiques des anticorps

Spécificité	CD45	CD34
Clone	J33	581
Hybridome	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogène	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Chaîne Ig	IgG1, chaînes légères	IgG1, chaînes légères
Espèce	Souris	Souris
Conjugaison	Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)	R Phycoérythrine (PE)
Rapport molaire	5–8 moles FITC / mole Ig	de 0,5 à 1,5 moles PE / mole Ig
Longueur d'onde d'excitation	488 nM (bleu-vert)	488 nM (bleu-vert)
Émission de fluorescence	de 504 à 541 nm (principalement vert)	de 568 à 590 nm (principalement orange)

- Les fluorosphères Stem-Count et Flow-Count consistent en 10 µm (diamètre nominal) de microsphères de polystyrène fluorescent dans un médium de suspension aqueuse de 20 mL, contenant un surfactant et 1 % de formaldéhyde. Chaque fluorosphère contient une teinture caractérisée par une plage d'émissions fluorescentes de 525 nm à 700 nm lorsqu'elle est excitée à 488 nm. La concentration de test de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count (fluorosphères / µL) est le résultat de nombreuses analyses répétées à l'aide d'un analyseur de taille de particules COULTER. La valeur spécifique du lot figure sur l'étiquette du flacon.
- Le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye est fourni avec 99 % de tampon phosphate salin (PBS : 0,01 M phosphate de sodium, 0,145 M chlorure de sodium, pH 7.2), avec 1 % de diméthylsulfoxyde (DMSO).
- La solution de lyse NH₄Cl est fournie à une concentration de 10X en solution de 20 mL. Elle contient un mélange de chlorure d'ammonium (NH₄Cl), de bicarbonate de potassium (KHCO₂), d'éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA).

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Les préparations anticorps monoclonaux contiennent 0,1 % d'azoture de sodium. L'azoture de sodium dans un environnement acide conduit à la formation d'acide azothydrique (azoture d'hydrogène), qui est un composé chimique extrêmement toxique. L'élimination par voie des égouts doit être effectuée avec de grandes quantités d'eau afin d'éviter l'accumulation dans la tuyauterie métallique et les explosions potentielles.
- Tout échantillon ou prélèvement, ainsi que tout élément matériel entrant en contact avec celui-ci, doit être manipulé comme une substance susceptible de transmettre une infection et éliminé en utilisant les précautions appropriées.
- Ne pipetez jamais à la bouche et évitez le contact des échantillons et des réactifs avec la peau et les muqueuses.
- N'utilisez pas les réactifs au-delà de la date de péremption figurant sur l'étiquette du flacon.
- Les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count contiennent 1 % de formaldéhyde. Évitez tout contact avec la peau et les yeux car le formaldéhyde peut causer des lésions irréversibles pour ces tissus. Ne respirez pas les vapeurs. Portez un équipement de sécurité adapté, comme des gants et une protection oculaire.
- Ne pas soumettre les réactifs Stem-Kit à une source de chaleur ou à de lumière forte pendant la conservation ou l'utilisation.
- Éviter toute évaporation et fuite de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count pouvant entraîner une erreur dans les résultats. Reboucher soigneusement les flacons après usage et conserver à la verticale.
- Assurez-vous de bien remettre les fluorosphères en suspension avant de les utiliser. Évitez de mélanger de manière excessive afin de minimiser la formation de bulles d'air. Ne pipetez pas de bulles d'air, au risque d'obtenir des résultats erronés.
- Utiliser une pipette jaugée (préférentiellement des pipettes jaugées préalablement ou à répétition) pour dispenser les échantillons et les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count pour éviter d'obtenir des résultats erronés.
- Respecter les techniques de pipetage recommandées par le fabricant des pipettes pour assurer un pipetage précis et exact des échantillons et des fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count, au risque d'obtenir des résultats erronés dans le cas contraire.
- Les échantillons colorés et lysés doivent être stockés sur de la glace et analysés sur le cytomètre en flux conformément aux informations de la section « Stabilité des échantillons traités », sans quoi des résultats erronés peuvent se produire.
- Veillez à ce qu'au moins 1 000 fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count soient comptées sinon la conversion automatique des résultats en valeurs absolues ne sera pas effectuée.
- Chaque lot de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count a une concentration précise de fluorosphères. Assurez-vous d'utiliser la bonne concentration lorsque vous déterminez les résultats des valeurs absolues.

14. Les méthodes de préparation nécessitant une étape de lavage ne doivent pas être utilisées, car cela entraînerait la perte d'un nombre inconnu de cellules.
15. Un temps d'incubation, un mélange ou une température autre que ceux spécifiés peuvent entraîner des résultats erronés.
16. Le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye contient 0,005 % de 7-AAD. Le 7-AAD pur est un carcinogène potentiel. Même si le complexe est fortement dilué, nous recommandons d'éviter le contact avec les yeux et la peau, de porter des vêtements et des gants de protection adaptés ainsi qu'un masque et des lunettes de protection.
17. Le marqueur de viabilité 7-AAD contient 1 % de diméthylsulfoxyde (DMSO). Le DMSO pur est un irritant. Même si le complexe est dilué, nous recommandons d'éviter le contact avec les yeux et la peau, de porter des vêtements et des gants de protection adaptés ainsi qu'un masque et des lunettes de protection.
18. Car le 7-AAD, en tant que chromophore, est sensible à la lumière. Conserver le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye dans le carton d'emballage du kit pour éviter une exposition continue.
19. Évitez d'exposer les échantillons mélangés à la lumière au cours de l'incubation.
20. Respectez les bonnes pratiques du laboratoire lors de la manipulation des réactifs.

CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

Fluorosphères Stem-Count

DANGER



H316

Provoque une légère irritation cutanée.

H317

Peut provoquer une allergie cutanée.

H350

Peut provoquer le cancer.

P201

Se procurer les instructions avant utilisation.

P280

Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.

P308+P313

EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : demander un avis médical/consulter un médecin.

P333+P313

En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin.

P362+P364

Enlever les vêtements contaminés et les laver avant utilisation.

Formaldéhyde 0,5 - 1,0 %

masse de réaction de:

5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one

[no CE 247-500-7] et

2-méthyl-4-isothiazolin-3-one

[no CE 220-239-6] (3:1) < 0,05 %

Colorant viabilité

ATTENTION

7-aminoactinomycine

H316

Provoque une légère irritation cutanée.

P332+P313

En cas d'irritation cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin.

Diméthyle sulfoxyde 0,5 - 2 %



La fiche technique santé-sécurité est disponible à l'adresse techdocs.beckman.com

CONDITIONS DE CONSERVATION ET STABILITÉ

Le réactif ouvert est stable jusqu'à la date d'expiration figurant sur le flacon stocké entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière. Ne pas utiliser après la date d'expiration. Ne pas les congeler. Les réactifs Stem-Kit sont stables pendant 30 jours après l'ouverture du flacon de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count. Les flacons ouverts doivent être refermés immédiatement après usage et stockés entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière. Ne PAS aliquoter les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count de leur flacon d'origine.

IMPORTANT: Une fuite de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count peut entraîner un risque de résultats faussés. Une fois ouvert, le flacon de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count doit être rangé en position verticale pour éviter toute possibilité de fuite. Ne pas utiliser les réactifs si des signes de fuite sont visibles.

Preuve de détérioration

Les situations suivantes peuvent être significatives d'une détérioration :

Réactifs Stem-Kit, sauf les fluorosphères Stem-Count

- Modification de l'apparence normale telle qu'elle est décrite ci-dessous

Réactif	Apparence normale
CD45-FITC / CD34-PE	Liquide clair à légèrement rosé
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Liquide clair à légèrement rosé
Colorant viabilité 7-aminoactinomycine	Liquide clair, légèrement rosé à rouge
Lysing Solution (Solution de lyse) NH ₄ CL	Liquide clair incolore

Stem-Count Fluorospheres

- L'apparence au cours de l'acquisition de populations secondaires contenant plus de 20 % de la population totale de fluorosphères.
- Une variation importante dans les valeurs obtenues pour les comptes ou échantillons.

IMPORTANT: Les réactifs ne doivent pas être utilisés s'ils présentent un signe réel de détérioration car ils pourraient fausser les résultats. En cas de signe de détérioration, contacter votre représentant Beckman Coulter local.

Préparation du réactif

1. Les réactifs bicolore CD45-FITC / CD34-PE et CD45-FITC / IsoClonic Control-PE sont utilisés directement du flacon sans dilution.
2. Les fluorosphères Stem-Count et Flow-Count sont utilisées directement du flacon sans dilution. Tout l'aluminium provenant du joint thermique doit être retiré du goulot du flacon à la première ouverture. Il est nécessaire de faire les mélanges corrects. Secouer le flacon de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count pendant 3 à 5 secondes avant la première utilisation de la journée.

Avant de pipeter du flacon, retourner le flacon de 3 à 5 fois.

Après agitation initiale au vortex au début de la journée, replacer le flacon de fluorosphères dans un endroit de 2 à 8 °C jusqu'à l'utilisation suivante.

Éviter l'évaporation ou la fuite de réactifs en rebouchant correctement les flacons après utilisation.

3. Le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye est utilisé directement du flacon sans dilution.
4. La Lysing Solution (solution de lyse) A 1X NH₄Cl doit être préparée quotidiennement : ajouter neuf volumes d'eau déionisée à un volume de solution de lyse concentrée 10X NH₄Cl. Ne pas mettre au réfrigérateur. Jetez la solution de lyse inutilisée 1X NH₄Cl à la fin de la journée.

Amener tous les réactifs à température ambiante (18–25 °C) avant utilisation.

MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

Exigences en termes d'échantillons

Résumé de la manipulation des échantillons :

Type d'échantillon	Méthode de blocage	Température de stockage	Âge de l'échantillon
Aphérèse	Algorithme	2–8 °C	24 heures
	Manuel	2–8 °C	24 heures
Moelle osseuse	Algorithme	2–8 °C	24 heures
	Manuel	2–8 °C	24 heures
Sang de cordon	Algorithme	18–25 °C	24 heures
	Manuel	18–25 °C	24 heures
Sang total normal	Algorithme	18–25 °C	20 heures
	Manuel	18–25 °C	20 heures
Sang total mobilisé	Algorithme	18–25 °C	20 heures
	Manuel	18–25 °C	20 heures

1. Les échantillons biologiques consistent en sang total frais normal ou périphérique mobilisé et en produits d'aphérèse frais ou décongelés, en sang de cordon ou en moelle osseuse.
2. Les cellules progénitrices hématopoïétiques (HPC) manipulées ou purifiées peuvent uniquement être analysées avec la méthode manuelle de gating.
3. Collecter selon une procédure aseptique les produits d'aphérèse, les échantillons de sang périphérique, les échantillons de sang du cordon ou les échantillons de moelle osseuse dans un tube de prélèvement sanguin vide et stérile avec un anticoagulant formule A ACD ou K3 EDTA.
4. Les échantillons de sang total et de sang total mobilisé prélevés dans des tubes anticoagulants peuvent être conservés jusqu'à 20 heures à température ambiante (18–25 °C) avant la coloration.
5. Les échantillons de sang de cordon prélevés dans des tubes anticoagulants peuvent être conservés jusqu'à 24 heures à température ambiante (18–25 °C) avant la coloration.
6. Les produits d'aphérèse prélevés et les échantillons de moelle osseuse peuvent être conservés jusqu'à 24 heures à une température comprise entre 2 °C et 8 °C avant la coloration.
7. Avant la préparation, veiller à ce que la concentration de leucocytes (WBC) ne soit pas supérieure à 30×10^9 cellules WBC / L. Si nécessaire, diluer l'échantillon avec HBSS ou équivalent pour atteindre une valeur moyenne de 15×10^9 cellules WBC / L. Enregistrer le facteur de dilution pour le calcul de la valeur absolue de l'HPC final.
8. De faibles concentrations de protéines peuvent entraîner une accumulation de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count et des comptes de cellules faussés. La dilution d'échantillons avec une concentration pauvre en protéines doit être effectuée à l'aide d'un tampon enrichi en protéines.
9. Tous les échantillons doivent être traités avec des réactifs Stem-Kit comprenant le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye.

Procédure de Traitement des Echantillons

Effectuez les tests en double, en suivant les « ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry » (instructions ISHAGE pour la détermination des cellules CD34+ par cytométrie en flux) (1).

REMARQUE: Pour le processus des cellules de contrôle Stem-Trol, veuillez vous référer à la fiche dans le paquet de cellules de contrôle Stem-Trol pour plus d'instructions en cas d'emploi de la méthode manuelle. Référez-vous au stemONE System Guide (guide du système stemONE) fourni avec les logiciels stemONE ou au stemCXP System Guide (guide du système stemCXP) pour avoir des instructions complètes si vous utilisez la méthode d'analyse automatisée.

1. Étiquetez trois tubes pour chaque échantillon, comme suit :
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipeter 20 µL de réactif CD45-FITC / CD34-PE dans les tubes : 45/34/7-AAD #1 et 45/34/7-AAD #2.
3. Pipetez 20 µL de réactif CD45-FITC / IsoClonic Control-PE dans le tube : 45/CTRL/7-AAD.
4. Pipeter 20 µL de marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye dans tous les tubes.

IMPORTANT: Risque de lyse incomplète en cas de résidus d'échantillon de sang sur la partie supérieure ou latérale du tube à essai. Pipeter soigneusement pour éviter que le sang n'entre en contact avec la partie supérieure ou latérale du tube à essai. Nettoyer le tube d'échantillon avec un coton-tige si nécessaire, afin d'enlever toute trace de l'échantillon de sang sur la partie supérieure ou latérale du tube à essai.

5. A l'aide d'une pipette jaugée préalablement ou d'une pipette à répétition calibrée, pipeter 100 µL de l'échantillon patient dans le tube.
6. Vortexer le tube immédiatement pendant 5 secondes.
7. Incuber tous les tubes à température ambiante (18–25 °C) pendant 20 minutes, à l'abri de la lumière.
8. Après incubation, ajouter 2 mL de 1X NH₄Cl Lysing Solution préparé dans chaque tube d'échantillon et agiter immédiatement au vortex pendant 5 secondes.

REMARQUE: Pour plus de détails sur la préparation de la Lysing Solution (solution de lyse), voir la rubrique 7.2 PRÉPARATION DU RÉACTIF ci-dessus.

IMPORTANT: Risque de résultats erronés si des bulles d'air sont pipetées. Mélanger les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count de manière excessive peut entraîner la formation de bulles d'air. Évitez de mélanger les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count de manière excessive et ne pipetez pas de bulles d'air dans les tubes d'échantillon.

9. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes, à l'abri de la lumière.
10. Mélanger doucement fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count en retournant le flacon 3 à 5 fois avant l'utilisation.
11. Avant l'acquisition, et immédiatement après l'étape 9, pipeter 100 µL de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count dans chacun des trois tubes à l'aide d'une pipette à déplacement positif ou d'une pipette à répétition.
12. Agiter immédiatement chaque tube au vortex pendant 5 secondes.

REMARQUE: Pour plus de détails sur la préparation de la Lysing Solution (solution de lyse), voir la rubrique 7.2 PRÉPARATION DU RÉACTIF ci-dessus.

Récapitulatif de la coloration des échantillons

Réactifs / Échantillons	45/34/7-AAD #1	Étiquette de tube à essai 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
Colorant viabilité 7-aminoactinomycine	20 µL	20 µL	20 µL
Echantillon	100 µL	100 µL	100 µL
Agiter au vortex — Laisser incuber à température ambiante pendant 20 minutes. Conserver à l'abri de la lumière.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Agiter au vortex — Laisser incuber à température ambiante pendant 10 minutes. Conserver à l'abri de la lumière.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex			
Pour les produits d'aphérèse prélevés, les échantillons de sang de cordon et de moelle osseuse, ne pas attendre plus de 60 minutes sur la glace avant l'acquisition.			
Pour les échantillons de sang total et de sang total mobilisé, ne pas attendre plus de 45 minutes sur la glace avant l'acquisition.			
Analyser les échantillons décongelés immédiatement.			
Protéger de la lumière			

Stabilité des échantillons traités :

- Pour les produits d'aphérèse prélevés, les échantillons de sang de cordon et de moelle osseuse, après l'ajout des fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count, ne pas attendre plus de 60 minutes sur la glace avant l'acquisition.
- Pour les échantillons de sang total et de sang total mobilisé, après l'ajout des fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count, ne pas attendre plus de 45 minutes sur la glace avant l'acquisition.
- Pour les échantillons congelés, l'acquisition doit être effectuée immédiatement après l'ajout de fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count.
- Les échantillons traités doivent être stockés sur de la glace à l'abri de la lumière et limiter l'exposition à température ambiante autant que possible pendant l'acquisition.

CONTENU

Les agents de conservation à base d'azoture de sodium peuvent former des composés explosifs dans les conduites d'évacuation métalliques. Voir le bulletin NIOSH : Explosive Azide Hazard (16/8/76) (Dangers d'explosion de l'azide). Pour éviter l'accumulation potentielle des composés d'azoture, rincer les tuyaux d'évacuation à l'eau après l'élimination de réactifs non dilués. L'élimination de l'azoture de sodium doit se faire conformément aux réglementations locales en vigueur.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI AVEC CE COFFRET:

1. Eau déionisée.
2. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Solution saline équilibrée de Hank) ou équivalent
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).

4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Alternative aux Stem-Count Fluorospheres : Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
9. Bain d'eau glacée
10. Tubes à essai en plastique (12 x 75 mm)
11. Pipette à répétition calibrée (20 µL, 100 µL, 2 mL) et embouts ou pipette jaugées préalablement (20 µL, 100 µL, 2 mL) et embouts
12. Pipettes standard étalonnées (20 µL, 100 µL, 2 mL) et embouts.
13. Agitateur vortex.
14. Chronomètre.
15. Cytomètre en flux.
16. Kit logiciel stemCXP 2.0, stemCXP version 2.0, WIN 7, RÉSERVÉ à l'analyse automatisée d'échantillons sur un système de cytomètre en flux FC 500 équipé du logiciel CXP (Version 2.0).

RÉSULTATS

Configuration du protocole d'analyse

Le cytomètre en flux doit être équipé pour détecter le Forward Scatter (diffusion avant), le Side Scatter (diffusion latérale) et les quatre canaux de fluorescence. Pour le canal FL3 (pour la surveillance des fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count) utiliser un filtre passe-bande de 620 nm. Pour le canal FL4 (pour la surveillance du marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye) utiliser un filtre passe-long de 675 nm.

Veiller à ce que le cytomètre en flux soit correctement aligné et standardisé pour l'intensité de la fluorescence.

9.2.3 S'assurer que le cytomètre en flux est correctement ajusté pour les compensations de fluorescence.

REMARQUE: Pour l'analyse d'échantillons, toutes les régions sont approximatives jusqu'à la fin de l'acquisition du tube 45/34/7-AAD #1. Les régions sont optimisées conformément au protocole et ensuite NE SONT PAS ajustées pour les deuxième et troisième tubes dans le panel.

Une série de 8 histogrammes et la même configuration de gating doit être respectée pour l'analyse des échantillons (voir ci-dessous). Le même schéma de configuration avec des séries de 8 histogrammes doit être respecté en utilisant les cellules de contrôle CD34+. Les régions A, B, C et D (cf. la rubrique Création de région pour la définition des régions) doivent être modifiées pour inclure les caractéristiques du groupe des cellules de contrôle CD34+.

Création des Histogrammes:

Créer les histogrammes de la manière suivante :

1. Créer l'Histogramme 1 en plaçant le FL1 CD45-FITC vs. le Side Scatter (diffusion latérale).
2. Créer l'Histogramme 2 en plaçant le FL2 CD34-PE vs. le Side Scatter (diffusion latérale).
3. Créer l'Histogramme 3 en plaçant le FL1 CD45-FITC vs. le Side Scatter (diffusion latérale).
4. Créer l'Histogramme 4 en plaçant le Forward Scatter (diffusion avant) vs. le Side Scatter (diffusion latérale).
5. Créer l'Histogramme 5 en plaçant le FL1 CD45-FITC vs. le FL2 CD34-PE.
6. Créer l'Histogramme 6 en plaçant le Forward Scatter (diffusion avant) vs. le Side Scatter (diffusion latérale).
7. Créer l'Histogramme 7 en plaçant Time vs. les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count FL3.
8. Créer l'Histogramme 8 en plaçant le FL4 marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye vs. le Side Scatter (diffusion latérale).

Les Histogrammes 1 à 4 sont destinés à caractériser CD34+ HPC, un processus qui peut être retardé jusqu'à l'étape de l'analyse. Ces quatre premiers histogrammes sont configurés conformément aux « ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry » (recommandations ISHAGE pour CD34+ détermination cellulaire de la cytométrie en flux) (1, 2). Les Histogrammes 5 à 7 sont destinés à surveiller les paramètres importants pendant l'étape d'acquisition. Ces derniers comprennent le discriminateur du Forward Scatter (diffusion avant), le nombre d'événements CD45+ à recueillir et l'accumulation correcte de singulets fluorosphères.

L'Histogramme 8 est destiné à différencier et analyser les événements viables des événements non viables.

Création des Régions

Créer les régions de la manière suivante:

1. Histogramme 1 — Créez une région rectilinéaire A sur l'Histogramme 1 pour inclure tous les CD45+ leucocytes et éliminer les plaquettes, les débris des hématies et les agrégats.
2. Histogramme 1 — Créer une région amorphe E sur l'histogramme 1 pour inclure les lymphocytes (CD45 brillant, Side Scatter (diffusion latérale) bas).
3. Histogramme 2 — Créer une région rectilinéaire B sur l'Histogramme 2 pour inclure tous les événements CD34+. Définir un arrêt à 75 000 événements (événements CD45+) pour l'Histogramme 2.
4. Histogramme 3 — Créer une région amorphe C sur l'Histogramme 3 pour inclure tous les événements CD45faibles regroupés.
5. Histogramme 4 — Créer une région amorphe D sur l'Histogramme 4 pour inclure tous les événements regroupés avec un Side Scatter (diffusion latérale) intermédiaire et un Forward Scatter (diffusion avant) intermédiaire à élevé.
6. Histogramme 5 — Créer une région quadstat I dans l'Histogramme 5 pour vérifier la limite inférieure de l'expression de CD45 sur les événements CD34+.
7. Histogramme 5 — Créer une région amorphe H sur l'Histogramme 5 pour encercler toutes les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count, y compris les doublets. La région H doit se situer dans le coin supérieur droit de l'Histogramme 5.

REMARQUE: s'assurer que la région H est dessinée comme une région AMORPHOUS (AMORPHE).

8. Histogramme 5 — Créer une région K rectilinéaire (nommée « listgate – » (limite des listes)) sur l'Histogramme 5. Créer les limites de la région K à la première décade logarithmique de l'histogramme à deux paramètres. Cette région K permet d'éliminer les événements négatifs doubles durant l'acquisition afin d'analyser 75 000 événements CD45+ pertinents.
9. Histogramme 6 – Copier la région D de l'Histogramme 4 en tant que région F de l'Histogramme 6.
10. Histogramme 7 — Créer une région rectilinéaire G sur l'Histogramme 7 pour englober uniquement les singulets fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count. La région G peut être étiquetée « CAL » pour permettre le calcul automatique des nombres absolus de CD34+ HPC (se référer au manuel de l'instrument pour plus de détails).
11. Histogramme 8 — Créer une région rectilinéaire J sur l'Histogramme 8 pour inclure les leucocytes viables (événements négatifs 7-AAD).

Création des Fenêtres d'Analyse

Créer les contrôles de la manière suivante :

1. Histogramme 1 — Attribuer « J » à l'Histogramme 1 pour afficher tous les événements viables. Si 7-AAD n'est pas utilisé, attribuer une région « H » à l'histogramme 1 pour afficher tous les événements excluant toutes les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count doublets inclus.
2. Histogramme 2 — Attribuer « AJ » (« A » si 7-AAD n'est pas utilisé) à l'histogramme 2 pour afficher les événements CD34+ viables (total si 7-AAD n'est pas utilisé).
3. Histogramme 3 — Attribuer « A » et « B » et « J » (« A » et « B » si 7-AAD n'est pas utilisé) à l'histogramme 3 pour afficher les événements CD45+ / CD34+ viables (total si 7-AAD n'est pas utilisé).
4. Histogramme 4 — Attribuer « A » et « B » et « C » et « J » (« A » et « B » et « C » si 7-AAD n'est pas utilisé) à l'histogramme 4 pour afficher les événements en cluster CD45+ / CD34+ viables (total si 7-AAD n'est pas utilisé) avec diffusion latérale basse lors de l'exclusion des plaquettes et débris. Les événements de la région ABCDJ sont CD34+ HPC réellement viables.
5. Histogramme 5 – Non fenêtré pour visualiser tous les événements.
6. Histogramme 6 — Attribuer « EJ » (« E » si 7-AAD n'est pas utilisé) à l'histogramme 6 pour afficher les lymphocytes viables (total si 7-AAD n'est pas utilisé) en tant que vérification visuelle sur le discriminateur.
7. Histogramme 7 — Attribuer « H » à l'Histogramme 7 pour afficher toutes les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count, y compris les doublets.
8. Histogramme 8 — Attribuer « A » à l'Histogramme 8 pour afficher tous les événements CD45+.

Configuration de la cytométrie en flux

1. Vérifier que le cytomètre en flux est correctement aligné et optimisé pour les intensités de diffusion et de fluorescence des détecteurs FL1, FL2, FL3 et FL4 conformément aux instructions du fabricant et du laboratoire. Vérifier que la compensation de couleur est réglée sur le fonctionnement standard. Se référer au manuel de l'instrument pour davantage d'instructions.
2. Agiter au vortex le tube à essai pendant 5 secondes.
3. Exécuter l'acquisition de données sur le cytomètre en flux. Au moins 75 000 événements CD45+ doivent être analysés.

4. Pour l'analyse d'échantillons : ajuster le discriminateur et les régions en analysant le tube d'échantillon 45/34/7-AAD #1. Sauvegarder le protocole et analyser le 45/34/7-AAD #2 et les tubes 45/CTRL/7-AAD sans autres ajustements.

Exemple d'Analyse

Les histogrammes présentés en ANNEXE sont affichés par ordre croissant, comme dans le protocole.

Calcul de CD34+ HPC pour l'échantillon

Le nombre de CD34+ HPC est calculé avec la moyenne des résultats statistiques de la région D pour deux échantillons dupliqués (c'-à-d. 45/34/7-AAD #1 et 45/34/7-AAD #2).

Les résultats CD34+ HPC sont considérés valables si les résultats obtenus par le réactif CD45-FITC / IsoClonic Control-PE sont moins de 10 % des résultats de CD34+ HPC.

1. Faire la moyenne des résultats des tubes 45/34/7-AAD #1 et tubes 45/34/7-AAD #2 pour chaque échantillon (c.-à-d. les résultats imprimés des statistiques de la moyenne de la région D). Le nombre de CD34+ HPC peut présenter un écart de 10 % par rapport à la moyenne des échantillons dupliqués. La valeur obtenue avec le tube de contrôle 45/CTRL/7-AAD doit représenter moins de 10 % de la valeur moyenne obtenue à partir des tubes à essai pour valider les résultats

REMARQUES : Si la moyenne pour la valeur absolue obtenue pour le CD34+ HPC dupliqué se situe hors de la plage acceptée (c.-à-d. dépasse 10 %), déterminer si le pipetage a été correctement effectué, particulièrement pour les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count. Effectuer un contrôle visuel des rapports du cytomètre en flux et de la qualité des processus de coloration et de lyse dans les tubes à essai. Vérifier la manière dont les limites de la région ont été configurées.

Si la valeur obtenue avec le tube de contrôle 45/CTRL/7-AAD se situe hors de la plage de valeurs acceptées (c.-à-d. dépasse 10 % de la valeur absolue moyenne obtenue pour le dupliqué), détermine si le pipetage a été correctement effectué, particulièrement pour les fluorosphères Stem-Count ou Flow-Count. Effectuer un contrôle visuel des rapports du cytomètre en flux et de la qualité des processus de coloration et de lyse dans les tubes à essai. Vérifier la manière dont les limites de la région ont été configurées.

Si nécessaire, répéter l'étape d'acquisition avec l'addition d'un tube BLANK (vide) après le premier tube en double 45/34/7-AAD #1 et #2 et avant le tube 45/CTRL/7-AAD. Si nécessaire, recommencer toute la préparation avec de nouveaux tubes à essai en ajoutant le tube BLANK (vide). Acquérir et analyser à la fois les nouvelles et les précédentes séries de tubes d'échantillon. Comparer les deux résultats. S'ils ne concordent pas, contacter le représentant local de Beckman Coulter.

2. Si l'échantillon a été dilué, le résultat obtenu ci-dessus DOIT ÊTRE multiplié par le facteur de dilution approprié (Dil). Le résultat final obtenu est le compte absolu de CD34+ HPC (cellules / μ L).

Valeur absolue CD34+ HPC (cellules / μ L) = CD34+ HPC Résultats d'impression de la valeur absolue (cellules / μ L) x Dil

3. Pour les paquets d'aphérèse, le nombre total de CD34+ HPC par paquet peut être calculé à partir de la formule suivante :

Nombre total de CD34+ HPC par paquet = valeur absolue de CD34+ HPC (cellules / μ L) x 10^6 x volume du paquet (L)

Quand :

4. Pour le pourcentage de CD34+ HPC dans le calcul de la valeur de leucocytes CD45+, se référer à la formule suivante :

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Valeur absolue CD34+ HPC (cellules / } \mu\text{L)} \times 100}{\text{Valeur absolue leucocytes CD45+ (cellules / } \mu\text{L)}} \quad \text{(voir impression des résultats de la région D) / (voir impression des résultats de la région A)}$$

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Veillez à ce que le cytomètre en flux soit correctement aligné conformément aux recommandations du fabricant figurant dans les manuels d'utilisation de l'instrument. Les intensités cibles ont été établies afin d'optimiser la diffusion lumineuse et les réglages de fluorescence sont réglés pour analyser des échantillons colorés avec le réactif anticorps monoclonal CD45-FITC / CD34-PE et le réactif CD45-FITC / Isoclonic Control-PE.

Les isothiocyanates de fluorescéine (FITC) fluorochromes, la phycoérythrine (PE) et le marqueur 7-amino-actinomycine D (7-AAD) émettent à des longueurs d'ondes différentes, mais ils peuvent avoir un chevauchement spectral qui doit être

corrigé par compensation électronique. Les niveaux de compensation maximaux peuvent être établis en analysant, dans un histogramme à double paramètre, un échantillon de sang total injecté avec des Stem-Trol Control Cells colorées avec le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye et des réactifs de compensation appropriés en cas d'utilisation du logiciel CXP. Avec cette analyse, des ajustements sont faits pour s'assurer qu'aucune coloration ne se produit dans le quadrant bicolore avec un quelconque fluorochrome individuel.

Le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye (7-amino-actinomycine D) est utilisé pour identifier les cellules non-viables par analyse cytométrique pour permettre l'énumération des cellules viables intéressantes. Le marqueur est pris par les cellules mortes (événements clairs) qui sont ensuite séparées des cellules viables (événements négatifs) par gating (voir Histogramme 8).

Avant que les échantillons soient analysés une coloration de contrôle (cellules de contrôle Stem-Trol) doit être effectuée pour vérifier la réactivité de l'anticorps.

PERFORMANCE

Les caractéristiques de performances fournies sont basées sur les réactifs Stem-Kit employés avec un cytomètre en flux COULTER EPICS XL/XL-MCL avec le logiciel System II. Le stemCXP System Guide (guide du système stemCXP) donne des exemples de performances sur un FC 500 avec un logiciel CXP.

Valeurs attendues pour les gammes de référence

Des échantillons de sang total normal (n = 117) ont été prélevés au sein d'une population d'hommes (n = 58) et de femmes (n = 59) pour établir une plage de référence normale. L'étude a été effectuée par un site d'évaluation externe. Des essais répétés pour chacun des échantillons ont été préparés en suivant la notice dans le paquet de réactifs Stem-Kit. Un gating et une analyse manuels ont été effectués pour obtenir les valeurs de CD45+, CD34+ et CD34 %.

L'analyse statistique suggère une distribution non-gaussienne de la collection de données. En se fondant sur ces principes, on a employé une approche non-paramétrique (certaine) pour analyser les données. Les valeurs de CD45+, CD34+ et CD34 % ont été obtenues. Valeurs exprimées en termes de valeurs absolues (cellules / μL) pour CD45+ et CD34+ et le pourcentage du compte total des leucocytes (CD34 %) comme figurant dans le tableau ci-dessous.

Sang total normal : Plages de référence

Méthode manuelle (Analyse certaine)	n	CD45+ (cellules/ μL)				CD34+ (cellules/ μL)				CD34+ (%)			
		Min.	Max	Moyenne	ET (Écart type)	Min.	Max	Moyenne	ET (Écart type)	Min.	Max	Moyenne	ET (Écart type)
Manuel	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Ces valeurs sont censées être uniquement représentatives. Chaque laboratoire doit établir ses valeurs attendues à partir d'une population locale de donneurs normaux.

Linéarité

Des mesures répétées ont été effectuées sur chacune des 10 dilutions en série pour les 2 types d'échantillons : sang total périphérique injecté de CD34+ et sang total périphérique mobilisé. Une plage dynamique de 0 à 2 000 cellules / μL et une plage de sensibilité inférieure de 0 à 150 cellules / μL ont été obtenues pour des concentrations de CD34+ HPC. Les échantillons ont été préparés conformément à la notice du paquet de réactifs Stem-Kit et analysés avec le cytomètre en flux COULTER EPICS XL/XL-MCL. Les valeurs sont exprimées en valeurs absolues (cellules / μL). Les résultats ont été analysés en termes d'analyses de régression linéaire pour les valeurs attendues vs. les valeurs absolues pour les cellules répliquées moins endogènes CD34+. Voir les tableaux suivants.

Les pentes des lignes de régression données par les tracés pour les valeurs absolues CD34+ HPC montrent la mesure mathématique de linéarité. Ceci est confirmé par les biais de test à potentiel minimal comme il a été prouvé par les coordonnées d'origine y pour les analyses. Les valeurs absolues attendues montrent une corrélation importante avec les valeurs absolues obtenues.

Résultats de sang total injecté de CD34+

Voir graphique en annexe.

Résultats sang périphérique (mobilisé)

Voir graphique en annexe.

Exactitude de la méthode (Tableaux) (Résultats attendus vs. résultats obtenus).

L'exactitude de la méthode est définie comme le degré de correspondance entre les résultats attendus et les résultats obtenus pour les méthodes de gating et d'analyse manuelles et automatisées. Du sang total frais et normal a été injecté avec des cellules CD34+ à un niveau de 1 875 cellules / μL . Les énumérations de cellules ont été confirmées par un hématimètre de Malassez et diluées séquentiellement avec différentes concentrations. Les résultats attendus sont comparés aux résultats

obtenus pour la moyenne des mesures répétées en employant une analyse et un gating manuels et automatisés pour chaque niveau de dilution. Au niveau de la pente et des coordonnées d'origine, le test démontre qu'il n'y a pas de différence statistique entre le gating et l'analyse automatisés et les résultats attendus, ni entre l'analyse et le gating manuels et les résultats attendus.

Exactitude de la méthode — CD34+ (%)

Voir graphique en annexe.

Exactitude de la méthode — Valeur absolue de CD34+ (cellules / μ L)

Voir graphique en annexe.

Exactitude de la méthode — Leucocytes totaux — CD45+ (cellules / μ L)

Voir graphique en annexe.

Précision de la méthode (résultats automatiques contre manuels)

Le niveau d'exactitude entre les méthodes manuelle et automatisée du système stemONE a été étudié sur quatre sites d'évaluation externes en utilisant des échantillons de sang total périphérique frais et d'aphérèse frais ou décongelé, de sang de cordon et de moelle osseuse. Les intervalles de confiance (CI) ont été calculés avec des limites de 95 %.

Des échantillons de sang total (n = 59, provenant de trois sites), de produits d'aphérèse (n = 51, de trois sites), de sang de cordon frais (n = 29, de deux sites), de moelle osseuse fraîche (n = 33, de deux sites), des produits d'aphérèse décongelés (n = 23, d'un seul site), de sang de cordon décongelé (n = 31, de deux sites), de moelle osseuse décongelée (n = 20, d'un seul site) ont été préparés conformément à la notice figurant dans le paquet de réactifs Stem-Kit et analysés avec les cytomètres en flux COULTER EPICS XL/XL-MCL. Un gating et une analyse automatisés et manuels ont été effectués pour obtenir les valeurs de CD45+, CD34+ et CD34 %.

Exactitude des méthodes (Figures)

Échantillons de sang périphérique frais total (n = 59)

Voir graphique en annexe.

Échantillons d'aphérèse frais (n = 51)

Voir graphique en annexe.

Échantillons de sang de cordon frais total (n = 29)

Voir graphique en annexe.

Échantillons de moelle osseuse fraîche (n = 33)

Voir graphique en annexe.

Échantillons d'aphérèse décongelés (n = 23)

Voir graphique en annexe.

Échantillons de sang de cordon décongelés (n = 31)

Voir graphique en annexe.

Échantillons de moelle osseuse décongelés (n = 20)

Voir graphique en annexe.

Précision

Précision interlaboratoire

Des études ont été effectuées dans une installation clinique par trois opérateurs utilisant chacun un cytomètre en flux différent. Trois spécimens représentant la plage dynamique de CD34+ (de 0 à 2 000 cellules / μ L) ont été identifiés :

Plage basse :	sang mobilisé périphérique frais
Plage medium :	produit d'aphérèse
Plage élevée :	produit d'aphérèse

Ces échantillons ont été séparés en trois aliquotes, une aliquote de chaque niveau (faible, moyen, haut) a été fournie pour chacun des trois opérateurs. Des échantillons (n = 10) ont été préparés pour chaque aliquote conformément à la notice du paquet de réactifs Stem-Kit. Chaque opérateur a effectué une analyse sur un cytomètre en flux EPICS XL en utilisant un gating automatisé et manuel pour obtenir des valeurs de CD45+, de CD34+ et de CD34 %. Les valeurs sont exprimées en termes de pourcentages (%) du compte total de leucocytes et en tant que valeurs absolues (cellules / μ L).

Les résultats de l'étude de précision interlaboratoire par niveau sont donnés dans les tableaux suivants. Les valeurs obtenues pour la valeur absolue de CD45+ et CD34+ et les pourcentages de CD34 ont montré des petites variations prouvées par les moyennes, les déviations standards et les coefficients de variation pour les mesures répétées.

Voir graphique en annexe.

Précision intralaboratoire

Les échantillons couvrant la plage dynamique du test ont été obtenus en utilisant du sang périphérique total, de la moelle osseuse fraîche ainsi que des aphérèses et du sang de cordon frais et décongelés provenant de sites d'évaluation externes. Les échantillons de tests ont été préparés conformément à la notice du paquet de réactifs Stem-Kit et analysés avec des cytomètres en flux COULTER EPICS XL/XL-MCL en effectuant un gating et une analyse manuels pour obtenir les valeurs de CD45+, CD34+ et CD34 %.

Les valeurs données à CD45+, CD34+ et CD34 % dans les tableaux suivants montrent que la méthode d'analyse est reproductible comme les moyennes, les déviations standard et les coefficients de variation pour ces mesures le prouvent. Les tableaux de données en ANNEXE démontrent la précision intralaboratoire de ce test.

Voir graphique en annexe.

LIMITES

Référez-vous au stemCXP System Guide (Guide du système stemCXP) fourni avec le logiciel système stemCXP pour connaître les limitations si vous utilisez la méthode d'analyse automatisée.

- Les échantillons colorés et lysés doivent être stockés sur de la glace et analysés sur le cytomètre en flux conformément aux informations de la section « Stabilité des échantillons traités », sans quoi des résultats erronés peuvent se produire.
- Ne pas diluer, aliquoter ou congeler les réactifs. Les utiliser seulement tels qu'ils sont fournis.
- Les réactifs sont réservés à un usage de cytométrie en flux.
- Décongeler correctement les échantillons congelés pour assurer une coloration optimale.
- Toutes les hématies ne devraient pas lyser avec les conditions suivantes : présence d'hématies nucléées, de concentration de protéines anormales ou d'hémoglobinopathies. Ceci pourrait provoquer des résultats faussement bas de CD34 % en raison des hématies non-lysées comptés en tant que leucocytes. Les valeurs absolues de CD34+ et de CD45+ ne devraient pas en être affectées.
- Certains patients peuvent présenter des problèmes particuliers dus au nombre de populations cellulaires altéré ou très bas.
- Les résultats obtenus avec la cytométrie en flux peuvent être erronés si les fenêtres (gates) ne sont pas configurées correctement.
- Les réactifs Stem-Kit sont conçus pour être employés avec le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye pour déterminer les cellules viables HPC. Si votre laboratoire emploie une méthode de détermination de viabilité autre, suivre les bonnes pratiques de laboratoire générales et les procédures de contrôle de qualité de votre laboratoire pour assurer la qualité des résultats rapportés.

MARQUES

Beckman Coulter, le logo stylisé et les marques des produits et des services Beckman Coulter mentionnées ici sont des marques ou des marques déposées de Beckman Coulter, Inc. aux États-Unis et dans d'autres pays.

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

www.beckmancoulter.com

Légende des symboles

Un glossaire des symboles est disponible sur beckmancoulter.com/techdocs (document numéro B60062)



Stem-Kit Reagenzien

REF IM3630 50 Tests

Zur Verwendung als *In vitro*-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Stem-Kit-Reagenzien bestehen aus einem zweifarbigen, fluoreszierenden (FITC, PE) murinen monoklonalen Antikörper, einem zweifarbigen murinen fluoreszierenden (FITC, PE) isoklonen Kontroll-Antikörper, einer Absolutzahl-Reagenz, einer Zellviabilitäts-Reagenz und einer Lyse-Reagenz. Es ist als „In-vitro-Diagnostikum“ für die gleichzeitige Identifikation und Zählung von CD45+ und dualpositiven CD45+- und CD34+-Zellpopulationen in Prozentzahlen und Absolutzahlen in biologischen Proben mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zu den biologischen Proben gehört frisches, normales oder mobilisiertes peripheres Vollblut, frische oder aufgetaute Apherese-Produkte, Nabelschnurblut und Knochenmark. Die Messungen der Zellpopulation können entweder mit einer automatisierten oder einer manuellen Methode für Gating und Analyse bestimmt werden.

Eine vollständige Anleitung bei Verwendung der manuellen Methode ist in der Packungsbeilage der Stem-Kit Reagents enthalten. Eine vollständige Anleitung bei Verwendung der automatisierten Methode ist im stemCXP System Guide (System-Handbuch) des stemCXP 2.0-Softwarekits und der stemCXP-Version 2.0, WIN 7 enthalten.

ZUSAMMENFASSUNG

Hematopoietic Progenitor Cells (HPC, hämatopoetische Vorläuferzellen)

Die Stem-Kit-Reagenzien wurden entwickelt, um humane hämatopoetische Vorläuferzellen (HPC) anhand der folgenden Kriterien zu identifizieren: „Echte CD34+ Zellen (a) exprimieren das CD34-Antigen, (b) exprimieren das CD45-Antigen mit einer für Blasten charakteristischen Färbungsintensität (d. h. leicht erkennbar, aber in geringeren Bereichen als Lymphozyten und Monozyten) und (c) zeigen die geringe seitliche und geringe bis mittlere nach vorne gerichtete Lichtstreuung, die für Blasten charakteristisch ist“ (1). Der Ausschluss toter CD34+ HPC von der Zählung lebensfähiger CD34+ HPC wird mithilfe des 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoffes erreicht (2).

CD34

Das CD34-Antigen ist eine Familie von unterschiedlich glykosylierten, einkettigen und transmembranösen Glykoproteinen vom Typ I (3, 4, 5). Es wird in praktisch allen hämatopoetischen Vorläuferzellen, einschließlich multipotenter Stammzellen, exprimiert. Die CD34-Epitope wurden in drei Klassen aufgeteilt, abhängig von ihrer Empfindlichkeit gegenüber Neuraminidase und Mannheimia-haemolytica-Glykoprotease (6). Der monoklonale Antikörper (mAb) CD34, der in den Reagenzien des Stem-Kits zum Einsatz kommt, wird 581 genannt. Er erkennt insbesondere ein Klasse-III-Epitop des CD34-Moleküls (7), wie durch enzymatische Spaltungsmuster definiert (6, 8). Dieser monoklonale Antikörper 581 wurde CD34 während des 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5. HLDA-Workshop zu menschlichen Leukozyten-Differenzierungsantigenen) in Boston, Massachusetts, USA, im Jahr 1993 zugewiesen (7).

CD45

Der CD45-Antikörper erkennt Mitglieder der CD45-Familie der Pan-Leukozyten-Antigene mit Molekülmassen von 180, 190, 210 und 220 kD (9, 10, 11). Er ist auch als LCA (leukocyte common antigen) bekannt. Das CD45-Antigen wird auf jeder Art von hämatopoetischen Zellen exprimiert, ausgenommen reife Erythrozyten und ihre unmittelbaren Vorläufer (11, 12). Er wurde nicht in differenziertem nicht-hämatopoetischen Gewebe erkannt (12, 13, 14, 15). Der monoklonale Antikörper (mAb) CD45, der in den Reagenzien des Stem-Kits zum Einsatz kommt, wird J33 genannt. Er wurde CD45 während des 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3. HLDA-Workshop zu menschlichen Leukozyten-Differenzierungsantigenen) in Oxford, England, im Jahr 1986 zugewiesen (16).

7-AAD

7-Aminoactinomycin D (7-AAD) Vitalitätsfarbstoff ist ein Analog von Actinomycin D, das eine substituierte Aminogruppe an der 7. Position der Chromophore enthält. Der 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff fügt sich zwischen die DNA-Basen Cytosin und Guanin (15). Actinomycine sind biologisch aktive Substanzen und enthalten ein 2-Amino-4,6-Dimethylphenoxazin-3-Chromophor und zwei zyklische Pentapeptide (17). Actinomycine bilden stabile Komplexe mit doppelsträngiger Desoxyribonucleinsäure (DNA), aber weder mit doppelsträngiger Ribonucleinsäure (RNA) noch mit RNA-DNA-Hybriden oder einzelsträngiger DNA oder RNA (15, 18).

Aufgrund der spektralen Eigenschaften des 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoffes ist dieses Molekül besonders für durchflusszytometrische Analysen geeignet (17). Die maximale Absorption des 7-AAD-/DNA-Komplexes befindet sich im grünen Spektralbereich und ist daher für ein Zytometer mit Argonlaser geeignet (Anregungswellenlänge von 488 nm) (15). Die tiefe Fluoreszenzemission des 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoffes (635 bis 675 nm) vereinfacht die Anwendung dieser Probe in Kombination mit den mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) konjugierten Antikörpern, da im Gegensatz zu Propidiumiodid (PI) der 7-AAD-/DNA-Komplex nur einen geringen spektralen Overlap mit FITC und PE aufweist (17).

Apoptische, nekrotische Zellen und/oder beschädigte Zellen sind Störquellen für die durchflusszytometrische Analyse lebensfähiger Zellen. Nicht lebensfähige Zellen werden analysiert und unterschieden, indem eine positive Färbung mit 7-AAD beobachtet wird, wohingegen die lebensfähigen Zellen ungefärbt (negativ) bleiben (19).

Durchflussszytometersysteme

Durchflussszytometersysteme (FC 500) wenden die Prinzipien der Durchflussszytometrie für die Analyse biologischer Proben an, um unterschiedliche Zellpopulationen durch die Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper und Fluorochrome zu identifizieren. Der vorliegende Test nutzt FC 500-Durchflussszytometersysteme mit CXP-Systemsoftware zur Analyse von Proben.

PRINZIP

Dieser Test basiert auf der Fähigkeit der monoklonalen Antikörper, an die Oberfläche von Zellen zu binden, die spezifische Antigendeterminanten exprimieren. Die Reagenz CD45-FITC / CD34-PE in den Stem-Kit-Reagenzien ist eine Kombination aus zwei murinen monoklonalen Antikörpern, die jeweils mit einem spezifischen Fluorochrom und spezifisch für ein anderes Zelloberflächenantigen konjugiert sind. Eine spezifische Zelloberflächenfärbung wird durch die Inkubation der Doppelproben eines biologischen Probenmaterials mit einer zweifarbigen CD45-FITC / CD34-PE Reagenz erzielt.

Ein zusätzlicher Test derselben Probe wird mit dem Reagenz CD45-FITC / IsoClonic Control-PE gefärbt, um die unspezifische Bindung des monoklonalen Antikörpers CD34-PE zu überprüfen. 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff, ein Nukleinsäurefarbstoff, der an zugängliche Basenpaare (zelluläre DNA) bindet, wird eingesetzt, um zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Zellen zu unterscheiden. Die Erythrozyten jeder Probe werden mit 1X NH₄Cl-Lyselösung lysiert. Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres (das Absolutzahl-Reagenz) werden hinzugefügt und die übrigen Zellen mit Durchflussszytometrie analysiert. Die Kontrollreagenzien für Instrument- und Probenqualität liefern die Prozess- und Qualitätskontrolle für den Assay: Flow-Check Fluorospheres, Flow-Set Fluorospheres, angemessene Ausgleichsreagenzien und Stem-Trol Control Cells.

BEISPIELE KLINISCHER ANWENDUNGEN

Eine Chronologie der wissenschaftlichen Berichte zu hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPC) zeigt, dass frühe Studien die Zählung kernhaltiger Zellen zur Quantifizierung genutzt haben. Nachfolgende Studien zu Assays mit koloniebildenden Einheiten (KBE) ermöglichten grobe Annäherungen an die Populationen der Vorläuferzellen. Auf die zeitintensiven KBE-Assays folgte die Entdeckung des CD34-Zelloberflächenmoleküls. Es wurde entdeckt, dass CD34 auf der Oberfläche früher hämatopoetischer Zellen und hämatopoetischer koloniebildender Zellen im Knochenmark und peripheren Blut vorhanden ist (20). Monoklonale Antikörper, die gegen das CD34-Molekül gerichtet sind, wurden anschließend entwickelt und für die Durchflussszytometrie eingesetzt. Die durchflussszytometrische Bestimmung von CD34 ist heute eine weit verbreitete Methode, um hämatopoetische Vorläuferzellen und Stammzellen zu analysieren.

Im Knochenmark normaler Personen können 1 bis 3 % der Zellen, die das CD34-Antigen exprimieren, eine langfristige multilineare Hämatopoese wiederherstellen (3, 20). Im peripheren Blut normaler Personen tragen weniger als 0,1 % der zirkulierenden Zellen das CD34-Antigen (1, 21). Der Einsatz der Reagenzien des Stem-Kits bietet eine einfache, schnelle und präzise Durchflussszytometriemethode, um die hämatopoetische Vorläuferzellen und die Stammzellen im peripheren Blut, Leukapherese-Produkte, Knochenmark und Nabelschnurblut zu zählen.

REAGENZIENINHALT

Die Stem-Kit Reagenzien enthalten Folgendes:

- CD45-FITC / CD34-PE Reagenz (45/34) – 1 Fläschchen.
 - CD45-FITC/IsoClonic Control-PE Reagenz (45/CTRL) – 1 Fläschchen.
 - Stem-Count Fluorospheres – 1 Fläschchen.
 - 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff – 1 Fläschchen.
 - 10X NH₄Cl Lysing Solution – 2 Fläschchen.
1. Diese Reagenzien müssen im Set, so wie im Kit geliefert, genutzt werden.
Flow-Count Fluorospheres, die äquivalent zu den Stem-Count Fluorospheres sind, können bei spezifischen Assay-Konzentrationen zur Bestimmung der Absolutzahl genutzt werden.
 2. CD45-FITC / CD34-PE ist eine einsatzbereite zweifarbige Reagenz, die in 2,2 mL phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit 2 mg/mL Rinderserumalbumin (BSA) und 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel bereitgestellt wird.
 3. CD45-FITC/IsoClonic Control-PE ist eine einsatzbereite zweifarbige Reagenz, die in 1,2 mL PBS mit 2 mg/mL BSA und 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel bereitgestellt wird. Die Reagenz CD45-FITC/IsoClonic Control-PE ist eine Mischung aus unkonjugierten und mit PE konjugierten (identisch zu CD34) monoklonalen Antikörpern 581. Diese Mischung fungiert als angemessene, isomorphe Kontrolle, um die unspezifische Bindung des CD34-PE mAk auf jeder einzelnen Probe zu überprüfen.

ANMERKUNG: Die Reagenzien CD45-FITC / CD34-PE und CD45-FITC / IsoClonic Control-PE dürfen nicht getrennt werden. Nach Durchführung der Tests und Kontrollen ist sicherzustellen, dass beide Reagenzien dieselbe Chargennummer auf dem Fläschchenetikett haben.

Zusammenfassung der Antikörper-Eigenschaften

Spezifität	CD45	CD34
Klon	J33	581
Hybridom	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig-Kette	IgG1, leichte Kappa-Ketten (κ)	IgG1, leichte Kappa-Ketten (κ)
Spezies	Maus	Maus
Konjugation	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	R-Phycoerythrin (PE)
Molverhältnis	5–8 mol FITC/mol Ig	0,5–1,5 mol PE/mol Ig
Erregungswellenlänge	488 nm (blaugrün)	488 nm (blaugrün)
Fluoreszenzemission	504 bis 541 nm (vorwiegend grün)	568 bis 590 nm (vorwiegend orangefarben)

- Die Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres bestehen aus 10 μm (Nenndurchmesser) fluoreszierenden Polystyrol-Mikrosphären in 20 mL einer wässrigen Suspension, die ein Tensid und 1 % Formaldehyd enthält. Bei einer Erregung bei 488 nm enthält jedes Fluorosphere einen Farbstoff, der einen Fluoreszenzemissionsbereich von 525 nm bis 700 nm hat. Die Assay-Konzentration der Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres (Fluorospheres/ μL) ergibt sich aus den multiplen Wiederholungsanalysen mit einem COULTER Partikelgrößenanalysensystem. Der spezielle Wert für die Charge ist auf dem Fläschchenetikett angegeben.
- Der 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff wird in 99 % phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS 0,01 M Natriumphosphat, 0,145 M Natriumchlorid, pH 7,2) mit 1 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bereitgestellt.
- Die NH_4Cl -Lyselösung wird als 20 mL Lösung mit 10-facher Konzentration bereitgestellt. Sie enthält eine Mischung aus Ammoniumchlorid (NH_4Cl), Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA).

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Monoklonale Antikörperpräparate enthalten 0,1 % Natriumazid. Natriumazid kann sich unter sauren Bedingungen zu Stickstoffwasserstoffsäure, einer hochgiftigen Substanz, zersetzen. Eine Entsorgung über Abwassersysteme sollte nur mit großen Mengen von laufendem Wasser erfolgen, um eine gefährliche Ansammlung in Metallrohren und potenzielle Explosionen zu vermeiden.
- Jede Probe und Entnahme sowie sämtliches Material, das damit in Berührung kommt, muss als potentiell infektiöse Substanz gehandhabt und unter Anwendung der entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden.
- Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Proben oder Reagenzien mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- Reagenzien niemals verwenden, wenn das Verfallsdatum auf dem Fläschchenetikett überschritten ist.
- Stem-Count Fluorospheres und Flow-Count Fluorospheres enthalten 1 % Formaldehyd. Vermeiden Sie den Kontakt mit Haut und Augen, da Formaldehyd irreversible Gewebeschäden verursachen kann. Dämpfe nicht einatmen. Geeignete Sicherheitsausrüstung, wie Handschuhe und Augenschutz tragen.
- Reagenzien des Stem-Kits während Lagerung und Gebrauch weder starkem Licht noch Hitze aussetzen.
- Verdunstung und Austritt der Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres vermeiden, da dies zu fehlerhaften Ergebnissen führen könnte. Fläschchen nach Gebrauch gut mit der Kappe verschließen und stehend lagern.
- Vor dem Gebrauch müssen Fluorospheres vollständig resuspendiert werden. Zu starkes Vermischen ist zu vermeiden, um die Blasenbildung zu reduzieren. Keine Luftblasen pipettieren, da dies zu fehlerhaften Ergebnissen führen könnte.
- Eine kalibrierte Pipette (vorzugsweise eine positive Versetzungs- oder Übertragungspipette) nutzen, um Proben und Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres zu übertragen, ansonsten können fehlerhafte Ergebnisse auftreten.
- Es müssen die vom Pipetten-Hersteller empfohlenen Pipettiertechniken angewendet werden, um eine genaue und präzise Pipettierung der Proben und der Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres zu ermöglichen und fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden.
- Gefärbte und lysierte Proben müssen auf Eis gelagert und gemäß den Informationen im Abschnitt „Stabilität aufbereiteter Proben“ auf dem Durchflusszytometer analysiert werden. Andernfalls können fehlerhafte Ergebnisse auftreten.
- Sicherstellen, dass mindestens 1000 Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres gezählt werden, ansonsten findet keine automatische Konvertierung der Ergebnisse zu Absolutzahlen statt.
- Jede Charge mit Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres hat eine bestimmte Fluorosphere-Konzentration. Sicherstellen, dass die richtige Assay-Konzentration verwendet wird, wenn die Ergebnisse für die Absolutzahl bestimmt werden.

14. Vorbereitungsmethoden, bei denen ein Waschschrift erforderlich ist, sollten nicht angewendet werden, da ein nicht bekannter Zellverlust möglich ist.
15. Die Verwendung von Inkubations- oder Mischzeiten oder Temperaturen, die von den angegebenen abweichen, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
16. 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff enthält 0,005 % 7-AAD. Reines 7-AAD ist ein potenzielles Karzinogen. Obwohl diese Substanz äußerst verdünnt ist, empfehlen wir, Haut- und Augenkontakt zu vermeiden, geeignete Schutzkleidung und Handschuhe zu tragen und einen angemessenen Augen-/Gesichtsschutz zu verwenden.
17. 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff enthält 1 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Reines DMSO ist ein Reizstoff. Obwohl diese Substanz verdünnt ist, empfehlen wir, Haut- und Augenkontakt zu vermeiden, geeignete Schutzkleidung und Handschuhe zu tragen und einen angemessenen Augen-/Gesichtsschutz zu verwenden.
18. Als Chromophor ist 7-AAD lichtempfindlich. 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff im Verpackungskarton des Kits aufbewahren, um während der Lagerung eine kontinuierliche Exposition gegenüber Licht zu vermeiden.
19. Minimieren Sie während der Inkubation die Exposition gemischter Proben gegenüber Licht.
20. Bei der Handhabung der Reagenzien sind die allgemeinen Regeln für eine gute Laborpraxis zu beachten.

GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Stem-Count-Fluorospheres
(fluoreszierende
Mikrokügelchen)

GEFAHR



H316

H317

H350

P201

P280

P308+P313

P333+P313

P362+P364

Verursacht leichte Hautreizungen.

Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Kann Krebs erzeugen.

Vor dem Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Formaldehyd 0,5 - 1,0 %

Reaktionsmasse aus
5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on
[EG-Nr. 247-500-7] und
2-Methyl-4-isothiazolin-3-on
[EG-Nr. 220-239-6] (3:1) < 0,05 %

7-AAD-Lebensfähigkeits-Farbstoff

ACHTUNG

H316

P332+P313

Verursacht leichte Hautreizungen.

Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Dimethylsulfoxid 0,5 - 2 %



Das Sicherheitsdatenblatt ist auf beckman.com/techdocs verfügbar.

LAGERUNGSBEDINGUNGEN UND STABILITÄT

Die ungeöffnete Reagenz ist bei einer lichtgeschützten Lagerung bei 2–8 °C bis zum am Fläschchen angegebenen Verfallsdatum stabil. Nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden. Nicht einfrieren. Die Stem-Kit-Reagenzien sind nach Öffnung der Fläschchen der Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres 30 Tage lang stabil. Die geöffneten Fläschchen müssen sofort nach der Verwendung wieder verschlossen und lichtgeschützt bei 2–8 °C gelagert werden. Die Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres NICHT direkt aus dem Originalfläschchen aliquotieren.

WICHTIG: Bei einem Austritt der Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres besteht das Risiko fehlerhafter Ergebnisse. Nach dem Öffnen müssen die Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres aufrecht gelagert werden, um mögliche Leckagen zu vermeiden. Reagenzien dürfen nicht mehr verwendet werden, wenn Anzeichen für Leckagen zu beobachten sind.

Verfallsanzeichen

Anzeichen für eine Zersetzung können in folgenden Situationen auftreten:

Stem-Kit-Reagenzien, ausgenommen Stem-Count Fluorospheres

- Eine Veränderung des normalen Erscheinungsbildes, wie unten angeführt

Reagenz	Normales Erscheinungsbild
CD45-FITC / CD34-PE	Klare, leicht rosafarbene Flüssigkeit
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Klare bis leicht rosafarbene Flüssigkeit
7-AAD-Lebensfähigkeits-Farbstoff	Klare, leicht rosafarbene bis rötliche Flüssigkeit
NH ₄ Cl-Lyselösung	Klare, farblose Flüssigkeit

Stem-Count Fluorospheres

- Das Erscheinungsbild sekundärer Fluoreszenzpopulationen, die mehr als 20 % der gesamten Fluorospheres-Population enthalten, während der Entnahme.
- Eine größere Variation der Werte für Zählungen oder Proben.

WICHTIG: Reagenzien dürfen nicht verwendet werden, wenn es Anzeichen für eine Zersetzung gibt, da dies zu fehlerhaften Ergebnissen führen könnte. Wenn es Anzeichen für eine Zersetzung gibt, wenden Sie sich an einen Beckman Coulter-Vertreter in Ihrer Nähe.

Vorbereitung des Reagenzes

1. Die zweifarbigen Reagenzien CD45-FITC / CD34-PE und CD45-FITC / IsoClonic Control-PE werden direkt ohne Verdünnung aus den Fläschchen verwendet.
2. Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres werden direkt ohne Verdünnung aus dem Fläschchen genutzt. Bei der ersten Öffnung muss das Aluminium des Wärmesiegels oben am Flaschenrand entfernt werden. Ein korrektes Mischen ist erforderlich. Bei der ersten Handhabung der Fläschchen mit Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres zu Beginn eines Arbeitstags für 3–5 Sekunden vortexen.

Vor der Pipettierung aus dem Fläschchen leicht durchmischen, indem Sie das Fläschchen 3- bis 5-mal über Kopf drehen.

Lagern Sie die Fluorosphere-Fläschchen nach dem initialen Vortexen zu Tagesbeginn bis zum weiteren Gebrauch bei 2–8 °C.

Die Röhrchen nach der Verwendung mit Kappen fest verschließen, um Verdunstung und Austritt des Reagenzes zu vermeiden.

3. 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff wird direkt ohne Verdünnung aus dem Fläschchen benutzt.
4. Eine 1X NH₄Cl-Lyselösung muss täglich vorbereitet werden: Fügen Sie neun Volumeneinheiten deionisiertes Wasser zu einer Volumeneinheit von 10-fach konzentrierter NH₄Cl-Lyselösung hinzu. Nicht kühlen. Die ungenutzte 1X NH₄Cl-Lyselösung am Ende des Arbeitstags entsorgen.

Alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18–25 °C) bringen.

HANDHABUNG DER PROBEN

Anforderungen an die Probe

Zusammenfassung zur Handhabung der Proben:

Probentyp	Gating-Methode	Lagerungstemperatur	Probenalter
Apherese	Algorithmus	2–8 °C	24 Stunden
	Manuell	2–8 °C	24 Stunden

Knochenmark	Algorithmus	2–8 °C	24 Stunden
	Manuell	2–8 °C	24 Stunden
Nabelschnurblut	Algorithmus	18–25 °C	24 Stunden
	Manuell	18–25 °C	24 Stunden
Normales Vollblut	Algorithmus	18–25 °C	20 Stunden
	Manuell	18–25 °C	20 Stunden
Mobilisiertes Vollblut	Algorithmus	18–25 °C	20 Stunden
	Manuell	18–25 °C	20 Stunden

1. Zu den biologischen Proben gehören frisches, normales oder mobilisiertes peripheres Vollblut, frische oder aufgetaute Apherese-Produkte, Nabelschnurblut und Knochenmark.
2. Manipulierte oder gereinigte hämatopoetische Vorläuferzellen (HPC) können nur mit der manuellen Gating-Methode analysiert werden.
3. Aphereseprodukte, Proben peripheren Bluts, Nabelschnurblut- und Knochenmarksproben unter Anwendung aseptischer Verfahren in ein steriles Unterdruck-Blutentnahmeröhrchen mit ACD in Formulierung A oder K3 EDTA als Antikoagulant entnehmen.
4. In Röhrchen mit Antikoagulant entnommene Vollblut- und mobilisierte Vollblutproben können vor dem Färben bis zu 20 Stunden lang bei Raumtemperatur (18–25 °C) gelagert werden.
5. In Röhrchen mit Antikoagulant entnommene Nabelschnurblutproben können vor dem Färben bis zu 24 Stunden lang bei Raumtemperatur (18–25 °C) gelagert werden.
6. Entnommene Apherese-Produkte und Knochenmarksproben können vor dem Färben bis zu 24 Stunden lang bei 2–8 °C gelagert werden.
7. Vor der Probenvorbereitung sicherstellen, dass die Leukozytenkonzentration nicht mehr als 30×10^9 LEU-Zellen/L beträgt. Bei Bedarf Probe mit HBSS oder gleichwertigem verdünnen, um einen Durchschnittswert von 15×10^9 LEU-Zellen/L zu erreichen. Verdünnungsfaktor zur Berechnung der endgültigen HPC-Absolutzahl aufzeichnen.
8. Geringe Proteinkonzentrationen können zur Verklumpung der Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres führen und fälschlicherweise hohe Absolutzahlen für Zellen ergeben. Die Verdünnung von Proben mit einer geringen Proteinkonzentration muss mit einem mit Protein angereicherten Puffer durchgeführt werden.
9. Alle Proben sollten mit den Stem-Kit-Reagenzien, einschließlich des 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoffs, verarbeitet werden.

Schritte zur Probenverarbeitung

Führen Sie die Tests gemäß den „The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (ISHAGE-Richtlinien für CD34+-Zellbestimmung mit Durchflusszytometrie)“ (1) doppelt durch.

ANMERKUNG: Eine vollständige Anleitung zur Verarbeitung von Stem-Trol Kontrollzellen mit der manuellen Methode finden Sie in der Packungsbeilage der Stem-Trol Kontrollzellen. Vollständige Anleitungen zur Verwendung der automatisierten Analysemethoden finden Sie im stemONE System Guide (System-Handbuch) der stemONE Systemsoftware und im stemCXP System Guide (System-Handbuch) der stemCXP Systemsoftware.

1. Für jedes Probenmaterial sind drei Röhrchen wie folgt zu beschriften:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. 20 µL der Reagenz CD45-FITC / CD34-PE in Röhrchen pipettieren: 45/34/7-AAD #1 und 45/34/7-AAD #2.
3. 20 µL der Reagenz CD45-FITC/IsoClonic Control-PE in das Röhrchen 45/CTRL/7-AAD pipettieren.
4. 20 µL 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff in alle Röhrchen pipettieren.

WICHTIG: Es besteht das Risiko einer unvollständigen Lysierung, wenn Blutproben oben oder an der Seite des Probenröhrchens verbleiben. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen, um zu verhindern, dass Blut an die Oberseite oder an die Seite des Probenröhrchens gelangt. Das Probenröhrchen bei Bedarf mit einem Baumwolltupfer reinigen, um alle Spuren der Blutprobe von der Oberseite oder der Seite des Probenröhrchens zu entfernen.

5. Pipettieren Sie 100 µL der Patientenprobe mit einer positiven Versetzungs- oder einer Übertragungspipette in das Röhrchen.
6. Das Röhrchen sofort 5 Sekunden lang rütteln.
7. Alle Röhrchen bei Raumtemperatur (18–25 °C) 20 Minuten lang vor Lichteinstrahlung geschützt inkubieren.

8. Nach der Inkubation 2 mL der vorbereiteten 1X NH₄Cl Lyselösung in jedes Röhrchen geben und sofort 5 Sekunden lang vortexen.

ANMERKUNG: Details zur Vorbereitung der Lyselösung finden Sie im oben stehenden Abschnitt 7.2 REAGENT PREPARATION (REAGENZIENVORBEREITUNG).

WICHTIG: Es besteht das Risiko fehlerhafter Ergebnisse, wenn Luftblasen pipettiert werden. Eine übermäßige Vermischung von Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres kann Luftblasen verursachen. Die Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres nicht übermäßig vermischen und keine Luftblasen in die Probenröhrchen pipettieren.

9. Bei Raumtemperatur 10 Minuten lang vor Lichteinstrahlung geschützt inkubieren.
10. Die Stem-Count oder Flow-Count Fluorospheres vorsichtig vermischen, indem Sie das Fläschchen vor der Verwendung 3- bis 5-mal vorsichtig umdrehen.
11. Vor der Erfassung und unmittelbar nach Schritt 9 unter Zuhilfenahme einer Kolbenhubpipette oder einer Repetierpipette 100 µL der Stem-Count-Fluorospheres oder Flow-Count-Fluorospheres in jedes der drei Röhrchen pipettieren.
12. Jedes Röhrchen sofort für 5 Sekunden vortexen.

ANMERKUNG: Details zur Vorbereitung der Lyselösung finden Sie im oben stehenden Abschnitt 7.2 REAGENT PREPARATION (REAGENZIENVORBEREITUNG).

Zusammenfassung Probenfärbung

Reagenzien/Proben	45/34/7-AAD #1	Teströhrchenetikett 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD-Lebensfähigkeits-Farbstoff	20 µL	20 µL	20 µL
Probe	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex – 20 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren lassen. Vor Lichteinfall schützen.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vortex – 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren lassen. Vor Lichteinfall schützen.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Verwirbelung			
Entnommene Aphereseprodukte, Nabelschnurblut- und Knochenmarksproben auf Eis aufbewahren und spätestens nach 60 Minuten erfassen.			
Im Falle von normalen Vollblutproben und mobilisierten Vollblutproben muss die Erfassung spätestens nach 45 Minuten auf Eis erfolgen.			
Die aufgetaute Probe unverzüglich analysieren.			
Vor Licht schützen			

Stabilität aufbereiteter Proben:

- Entnommene Aphereseprodukte, Nabelschnurblut- und Knochenmarksproben nach Zugabe von Stem-Count- oder Flow-Count-Fluorosphären spätestens nach 60 Minuten auf Eis erfassen.
- Im Falle von normalen Vollblutproben und mobilisierten Vollblutproben muss die Erfassung nach Zugabe von Stem-Count- oder Flow-Count-Fluorosphären spätestens nach 45 Minuten auf Eis erfolgen.
- Im Falle von gefrorenen Proben muss die Erfassung unmittelbar nach Zugabe der Stem-Count- oder Flow-Count-Fluorosphären erfolgen.
- Aufbereitete Proben müssen lichtgeschützt auf Eis gelagert werden. Auch während der Erfassung ist die Exposition gegenüber der Raumtemperatur so gering wie möglich zu halten.

INHALT

Natriumazid als Konservierungsmittel kann in metallischen Abflussleitungen explosive Verbindungen bilden. Siehe NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (16.8.76) (NIOSH-Bulletin: Gefahr durch explosive Azide).

Um eine mögliche Akkumulation von Azidverbindungen zu vermeiden, die Abwasserrohre nach der Entsorgung von unverdünntem Reagenz mit Wasser spülen. Natriumazid muss entsprechend den örtlichen behördlichen Vorschriften entsorgt werden.

BENÖTIGTE, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENE ARTIKEL:

1. Deionisiertes Wasser
2. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) oder gleichwertig
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Als Alternative zu Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
9. Bad in Eiswasser
10. Teströhrchen aus Plastik (12 x 75 mm)
11. Kalibrierte Übertragungspipette (20 µL, 100 µL, 2 mL) mit Spitzen oder kalibrierte positive Versetzungspipette (20 µL, 100 µL, 2 mL) mit Spitzen
12. Kalibrierte Standardpipetten (20 µL, 100 µL, 2 mL) mit Spitzen
13. Vortex-Rüttler
14. Zeitgeber
15. Durchflussszytometer.
16. stemCXP 2.0-Softwarekit, stemCXP-Version 2.0, WIN 7, NUR für die automatisierte Analyse von Proben auf dem FC 500-Durchflussszytometersystem mit der CXP-Software (Version 2.0).

ERGEBNISSE

Einrichtung des Analyseprotokolls

Der Durchflussszytometer muss zur Erkennung von „Forward Scatter“ (Vorwärtsstreuung), „Side Scatter“ (seitliche Streuung) und vier Fluoreszenz-Kanälen ausgestattet sein. Für den FL3-Kanal (für die Überwachung von Stem-Count oder Flow-Count Fluorospheres) einen 620-nm-Bandpassfilter benutzen. Für den FL4-Kanal (für die Überwachung von 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff) einen 675 nm langen Passfilter benutzen.

Sicherstellen, dass das Durchflussszytometer richtig justiert und für die Fluoreszenzintensität standardisiert ist.

Das Durchflussszytometer muss richtig für die Fluoreszenzkomensation justiert sein.

ANMERKUNG: Für die Probenanalyse sind alle Regionspositionen bis zur Erfassung des Röhrchens 45/34/7-AAD #1 Richtwerte. Die Regionen werden gemäß dem folgenden Protokoll optimiert und anschließend NICHT für das zweite und dritte Röhrchen im Panel angepasst.

Eine Reihe von 8 Histogrammen und ein Gating-Schema muss für die Probenanalyse befolgt werden (siehe unten). Für die CD34+-Kontrollzellen müssen dieselbe Reihe von 8 Histogrammen und dasselbe Gating-Schema befolgt werden. Die Regionen A, B, C und D (siehe die Überschrift „Region Creation“ (Regionerstellung) für eine Definition der Regionen) müssen angepasst werden, damit der Merkmals-Cluster für die CD34+-Kontrollzellen enthalten ist.

Erstellen der Histogramme

Folgende Histogramme anlegen:

1. Histogramm 1 für FL1 CD45-FITC vs. „Side Scatter“ (seitliche Streuung) erstellen.
2. Histogramm 2 für FL2 CD34-PE vs. „Side Scatter“ (seitliche Streuung) erstellen.
3. Histogramm 3 für FL1 CD45-FITC vs. „Side Scatter“ (seitliche Streuung) erstellen.
4. Histogramm 4 für „Forward Scatter“ (Vorwärtsstreuung) vs. „Side Scatter“ (seitliche Streuung) erstellen.
5. Histogramm 5 für FL1 CD45-FITC vs. FL2 CD34-PE erstellen.
6. Histogramm 6 für „Forward Scatter“ (Vorwärtsstreuung) vs. „Side Scatter“ (seitliche Streuung) erstellen.
7. Histogramm 7 für Zeit vs. FL3 Stem-Count oder Flow-Count Fluorospheres erstellen.
8. Histogramm 8 für FL4 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff vs. „Side Scatter“ (seitliche Streuung) erstellen.

Die Histogramme 1 bis 4 dienen der Charakterisierung von CD34+ HPC. Dieser Prozess kann bis zum Analyseschritt verzögert werden. Diese ersten vier Histogramme werden gemäß den ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (ISHAGE-Richtlinien für CD34+-Zellbestimmung mit Durchflussszytometrie) (1, 2). Die Histogramme

5 bis 7 sind zur Überwachung der Parameter gedacht, die während der Probenentnahme wichtig sind. Dazu gehören der „Forward Scatter“-Diskriminator (für die Vorwärtsstreuung), die Anzahl der zu sammelnden CD45+-Ereignisse und die richtige Akkumulation von Fluorosphere-Singulettten.

Das Histogramm 8 dient zur Analyse und Unterscheidung zwischen lebensfähigen Ereignissen und nicht lebensfähigen Ereignissen.

Festlegen der Regionen

Folgende Regionen anlegen:

1. Histogramm 1 – Eine geradlinige Region A für Histogramm 1 erstellen, um alle CD45+-Leukozyten einzuschließen und Blutplättchen, abgelagerte Erythrozyten und Ansammlungen zu beseitigen.
2. Histogramm 1 – Amorphe Region E für Histogramm 1 erstellen, um Lymphozyten einzuschließen (helles CD45, niedrige seitliche Streuung).
3. Histogramm 2 – Eine geradlinige Region B für Histogramm 2 erstellen, um alle CD34+-Ereignisse einzuschließen. Eine Endzahl von 75 000 Ereignissen (CD45+-Ereignissen) in Histogramm 2 festlegen.
4. Histogramm 3 – Eine amorphe Region C für Histogramm 3 zum Einschließen aller clusterförmigen CD45dim-Ereignisse erstellen.
5. Histogramm 4 – Eine amorphe Region D für Histogramm 4 erstellen, um alle Cluster-Ereignisse mit mittlerer seitlicher Streuung und mittlerer bis hoher Vorwärtsstreuung einzuschließen.
6. Histogramm 5 – Quadstat-Region I für Histogramm 5 erstellen, um die Untergrenze des CD45-Ausdrucks für CD34+-Ereignisse zu überprüfen.
7. Histogramm 5 – Eine amorphe Region H für Histogramm 5 erstellen, um alle Stem-Count oder Flow-Count Fluorospheres, einschließlich Dubletten, einzuschließen. Region H muss sich in der rechten oberen Ecke von Histogramm 5 befinden.

ANMERKUNG: Sicherstellen, dass Region H als Region vom Typ AMORPHOUS (amorph) gezeichnet wird.

8. Histogramm 5 – Geradlinige Region K mit der Bezeichnung „listgate“ (Listen-Gate) für Histogramm 5 erstellen. Die Grenzen der Region K als erste Protokolldekade der beiden Parameterhistogramme festlegen. Diese Region K ermöglicht die Beseitigung von doppelt negativen Ereignissen während der Probenentnahme, um die 75 000 relevanten CD45+-Ereignisse zu analysieren.
9. Histogramm 6 – Region D aus Histogramm 4 als Region F in Histogramm 6 kopieren.
10. Histogramm 7 – Eine geradlinige Region G für Histogramm 7 erstellen, um nur die Singulettten von Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres einzuschließen. Region G kann mit „CAL“ (Berechnung) beschriftet werden, um die automatische Berechnung der Absolutzahlen von CD34+ HPC zu ermöglichen (weitere Informationen finden Sie im Instrumentenhandbuch).
11. Histogramm 8 – Eine geradlinige Region J für Histogramm 8 erstellen, um lebensfähige Leukozyten einzuschließen (7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff negative Ereignisse).

Definieren der Gates

Folgende Gates anlegen:

1. Histogramm 1 – „J“ zu Histogramm 1 zuweisen, um alle lebensfähigen Ereignisse anzuzeigen. Wenn 7-AAD nicht verwendet wird, die Region „H“ dem Histogramm 1 zuweisen, um alle Ereignisse ausgenommen aller Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres, einschließlich Dubletten, anzuzeigen.
2. Histogramm 2 – „AJ“ („A“, wenn 7-AAD nicht verwendet wird) zu Histogramm 2 zuweisen, um alle lebensfähigen (alle, wenn 7-AAD nicht verwendet wird) CD34+-Ereignisse anzuzeigen.
3. Histogramm 3 – „A“, „B“ und „J“ („A“ und „B“, wenn 7-AAD nicht verwendet wird) zu Histogramm 3 zuweisen, um alle lebensfähigen (alle, wenn 7-AAD nicht verwendet wird) CD45+/-CD34+-Ereignisse anzuzeigen.
4. Histogramm 4 – „A“, „B“, „C“ und „J“ („A“, „B“ und „C“, wenn 7-AAD nicht verwendet wird) zu Histogramm 4 zuweisen, um lebensfähige (alle, wenn 7-AAD nicht verwendet wird) CD45+/-CD34+-Cluster-Ereignisse mit geringer seitlicher Streuung ohne Thrombozyten und Ablagerungen anzuzeigen. Ereignisse aus Region ABCDJ sind echte lebensfähige CD34+-HPC.
5. Histogramm 5 – Kein Gate, damit alle Ereignisse angezeigt werden.
6. Histogramm 6 – „EJ“ („E“, wenn 7-AAD nicht verwendet wird) zu Histogramm 6 zuweisen, um lebensfähige (alle, wenn 7-AAD nicht verwendet wird) Lymphozyten zur visuellen Überprüfung des Diskriminators anzuzeigen.
7. Histogramm 7 – „H“ zu Histogramm 7 zuweisen, um alle Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres, einschließlich Dubletten, anzuzeigen.
8. Histogramm 8 – „A“ zu Histogramm 8 zuweisen, um CD45+-Ereignisse anzuzeigen.

Einstellung des Durchflusszytometers

1. Es ist sicherzustellen, dass das Durchflusszytometer richtig justiert und für die Lichtstreuung und Fluoreszenzintensitäten der FL1-, FL2-, FL3- und FL4-Detektoren, gemäß den Angaben des Herstellers und den Laborrichtlinien, optimiert ist. Überprüfen, ob die Farbkompensation auf Standardbetrieb eingestellt ist. Weitere Anweisungen finden Sie im Instrumentenhandbuch.
2. Die Probenröhrchen 5 Sekunden lang drehen.
3. Die Datenerfassung mit dem Durchflusszytometer durchführen. Mindestens 75 000 CD45+-Ereignisse müssen analysiert werden.
4. Zur Probenanalyse: Diskriminator und Regionen durch Analyse des Probenröhrchens 45/34/7-AAD #1 justieren. Das Protokoll speichern und die Röhrchen 45/34/7-AAD #2 und 45/CTRL/7-AAD ohne weitere Einstellungen analysieren.

Analysebeispiel

Die im APPENDIX (Anhang) aufgeführten Histogramme werden in aufsteigender Reihenfolge gemäß den Zahlen im Protokoll angezeigt.

Berechnung von CD34+ HPC für Proben

Die Zahl von CD34+ HPC wird als Durchschnitt der statistischen Ergebnisse der Region D für die beiden Wiederholungsproben (d. h. 45/34/7-AAD #1 und 45/34/7-AAD #2) berechnet.

Die CD34+ HPC Ergebnisse werden als gültig betrachtet, wenn die Ergebnisse der CD45-FITC/IsoClonic Control-PE Reagenz weniger als 10 % der CD34+ HPC Ergebnisse betragen.

1. Den Durchschnitt der Ergebnisse von den Röhrchen 45/34/7-AAD #1 und 45/34/7-AAD #2 für jede Probe berechnen (d. h. den Durchschnitt der Druckergebnisse für die Statistik der Region D). Die Anzahl der CD34+ HPC kann innerhalb von 10 % des Mittelwerts der Doppelproben fallen. Der mit dem Kontrollröhrchen 45/CTRL/7-AAD erhaltene Wert muss weniger als 10 % des Durchschnittswertes der Teströhrchen betragen, um die Ergebnisse zu validieren.

HINWEISE: Wenn der Mittelwert für die Absolutzahl des Duplikats CD34+ HPC außerhalb des Bereichs annehmbarer Werte fällt (d. h. 10 % übersteigt), ist zu überprüfen, ob die Pipettierung korrekt durchgeführt wurde, insbesondere in Bezug auf die Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres. Die Berichte des Durchflusszytometers und die Qualität der Verfärbungs- und Lysierungsprozesse in Ihren Teströhrchen visuell überprüfen. Die Festlegung der Regionsgrenzen überprüfen.

Wenn der mit dem 45/CTRL/7-AAD enthaltene Wert außerhalb des Bereichs annehmbarer Werte fällt (d. h. 10 % des Mittelwerts der Absolutzahl für das Duplikat übersteigt), ist zu überprüfen, ob die Pipettierung korrekt durchgeführt wurde, insbesondere in Bezug auf die Stem-Count Fluorospheres oder Flow-Count Fluorospheres. Die Berichte des Durchflusszytometers und die Qualität der Verfärbungs- und Lysierungsprozesse in Ihren Teströhrchen visuell überprüfen. Die Festlegung der Regionsgrenzen überprüfen.

Bei Bedarf den Entnahmeschritt durch Hinzufügen eines LEERWERT-Röhrchens nach dem ersten doppelten Röhrchen 45/34/7-AAD #1 und #2 und vor dem Röhrchen 45/CTRL/7-AAD wiederholen. Bei Bedarf die gesamte Vorbereitung mit neuen Teströhrchen wiederholen und das LEERWERT-Röhrchen hinzufügen. Sowohl die neue als auch die vorherige Reihe Probenröhrchen erfassen und analysieren. Die beiden Ergebnisse vergleichen. Wenn keine Übereinstimmung vorliegt, wenden Sie sich an Ihren örtlichen Beckman Coulter-Mitarbeiter.

2. Wenn die Probe verdünnt wurde, MUSS das erhaltene Ergebnis mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor (dil.) multipliziert werden. Das Endergebnis gibt die Absolutzahl der CD34+ HPC (Zellen/ μ L) an.

$$\text{CD34+ HPC Absolutzahl (Zellen}/\mu\text{L)} = \text{CD34+ HPC Absolutzahl Druckergebnisse (Zellen}/\mu\text{L)} \times \text{dil.}$$

3. Für Apherese-Reagenzpacks kann die Gesamtzahl von CD34+ HPC pro Pack anhand der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{CD34+ HPC Gesamtzahl pro Pack} = \text{CD34+ HPC Absolutzahl (Zellen}/\mu\text{L)} \times 10^6 \times \text{Pack-Volumen (L)}$$

Wobei:

4. Für die Prozentzahl der CD34+ HPC innerhalb der Berechnung des CD45+ Leukozytenwerts siehe nachfolgende Formel:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{CD34+ HPC Absolutzahl (Zellen}/\mu\text{L)} \times 100}{\text{(d. h. Druckergebnisse für die Region D)}} \times 100$$

QUALITÄTSKONTROLLE

Es ist sicherzustellen, dass das Durchflusszytometer gemäß den Empfehlungen des Herstellers in den Instrumentenhandbüchern korrekt justiert ist. Die Zielintensitäten wurden ermittelt, um die Instrumenteneinstellungen für die Lichtstreuung und Fluoreszenz für die Analyse von Proben, die mit der monoklonalen Antikörper-Reagenz CD45-FITC / CD34-PE und der Reagenz CD45-FITC/Isoclonic Control-PE gefärbt wurden, zu optimieren.

Die Fluorochrome Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) senden unterschiedliche Wellenlängen aus, haben jedoch einen gewissen spektralen Overlap, der durch einen elektronischen Ausgleich korrigiert werden muss. Die optimalen Ausgleichsbereiche können durch die Analyse einer Vollblutprobe, versetzt mit Stem-Trol Control Cells, gefärbt mit 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff und angemessenen Ausgleichsreagenzien bei Einsatz der CXP-Software, in einem Dualparameter-Histogramm ermittelt werden. Bei dieser Analyse werden Einstellungen vorgenommen, um sicherzustellen, dass im zweifarbigen Quadranten keine Färbung mit einem individuellen Fluorochrom auftritt.

7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff (7-Aminoactinomycin D) wird genutzt, um mit einer durchflusszytometrischen Analyse nicht lebensfähige Zellen zu identifizieren und die Zählung der lebensfähigen Zellen von Interesse zu ermöglichen. Der Farbstoff wird von den abgestorbenen Zellen (helle Ereignisse) aufgenommen, die anschließend mittels Gating von den lebensfähigen Zellen (negative Ereignisse) ausgeschlossen werden (siehe Histogramm 8).

Vor Analyse der Proben sollte eine Assay-Kontrolle (Stem-Trol Kontrollzellen) gefärbt werden, um die Antikörper-Reaktivität zu überprüfen.

LEISTUNG

Die angegebenen Leistungsdaten basieren auf Stem-Kit-Reagenzien in Verwendung mit einem COULTER EPICS XL/XL-MCL Durchflusszytometer mit System II-Software. Beispiele für die Leistung eines FC 500 mit CXP-Software finden Sie im stemCXP System Guide (System-Handbuch).

Erwartete Werte für Referenzbereiche

Normale Vollblutproben (n = 117) wurden von einer Population von Männern (n = 58) und Frauen (n = 59) entnommen, um einen normalen Referenzbereich zu ermitteln. Diese Studie wurde an einem externen Studienstandort durchgeführt. Die Wiederholungstests für jede Probe wurden gemäß der Packungsbeilage der Stem-Kit-Reagenzien aufbereitet. Ein manuelles Gating und eine manuelle Analyse wurden durchgeführt, um die Werte für CD45+, CD34+ und CD34 % zu erhalten.

Die statistische Analyse deutet auf eine nicht gaussförmige Verteilung der gemessenen Daten hin. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein parameterfreier (robuster) Ansatz für die Datenanalyse gewählt. Die Werte CD45+, CD34+ und CD34 % wurden ermittelt. Die Werte werden als Absolutzahlen (Zellen/ μ L) für CD45+ und CD34+ und als Prozentzahl für die Leukozytengesamtzahl (CD34 %) angegeben, wie in der nachfolgenden Tabelle gezeigt.

Normale Vollblut-Referenzbereiche

Manuelle Methode (robuste Analyse)	n	CD45+ (Zellen/ μ L)				CD34+ (Zellen/ μ L)				CD34+ (%)			
		Min.	Max	Mittelwert	SD	Min.	Max	Mittelwert	SD	Min.	Max	Mittelwert	SD
Handbuch	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Die Werte dienen nur zu Veranschaulichungszwecken. Jedes Labor muss anhand der örtlichen Population normaler Spender eigene erwartete Werte festlegen.

Linearität

Wiederholungsmessungen wurden für jede der 10 seriellen Verdünnungen für 2 Probenotypen durchgeführt: mit CD34+ versetztes peripheres Vollblut und frisches mobilisiertes peripheres Vollblut. Ein dynamischer Bereich von 0 bis 2000 Zellen/ μ L und ein unterer Empfindlichkeitsbereich von 0 bis 150 Zellen/ μ L konnte für CD34+ HPC Konzentrationen erzielt werden. Die Proben wurden gemäß der Packungsbeilage der Stem-Kit-Reagenzien aufbereitet und mit einem COULTER EPICS XL/XL-MCL Durchflusszytometer analysiert. Die Werte sind als Absolutzahlen (Zellen/ μ L) angegeben. Die Ergebnisse wurden im Sinne linearer Regressionsanalysen für die erwarteten vs. erhaltenen Absolutzahlen für den Mittelwert der Wiederholungen abzüglich der endogenen CD34+-Zellen analysiert. Siehe nachfolgende Tabellen.

Die Steigung der Regressionslinien, die mit den Plots für die gesamten CD34+ HPC Absolutzahlen bereitgestellt werden, zeigen die mathematische Linearitätsmessung. Dies wird durch einen minimalen potenziellen Assay-Bias unterstützt, wie durch die Schnittpunkte mit der y-Achse für die Analysen nachgewiesen. Die erwarteten Absolutzahlen zeigen eine hohe Korrelation mit den gewonnenen Absolutzahlen.

Ergebnisse für das mit CD34+ versetzte Vollblut

Siehe Diagramm im Anhang.

Ergebnisse des peripheren (mobilisierten) Bluts

Siehe Diagramm im Anhang.

Methodengenauigkeit (Tabellen) (Erwartete vs. erhaltene Ergebnisse)

Die Methodengenauigkeit ist definiert als der Grad der Übereinstimmung zwischen den erwarteten und erhaltenen Ergebnissen für manuelle und automatisierte Gating- und Analysemethoden. Frisches, normales, peripheres Vollblut wurde mit gereinigten CD34+-Zellen versetzt, bis zu einem Wert von 1875 Zellen/ μ L. Die Zellzählung wurde mit einer Malassez-Zählkammer bestätigt und seriell in verschiedene Konzentrationen verdünnt. Die erwarteten Ergebnisse werden mit den erhaltenen Ergebnissen für den Mittelwert der doppelten Messungen verglichen, wobei automatisierte und manuelle Gating- und Analyseprozesse für jede Verdünnungsstufe eingesetzt wurden. Die Tests für die Steigung und die Ordinate im Achsenabschnitt zeigen keinen statistischen Unterschied, weder zwischen automatisiertem Gating und Analyse und den erwarteten Ergebnissen noch zwischen manuellem Gating und Analyse und den erwarteten Ergebnissen.

Methodengenauigkeit – CD34+ (%)

Siehe Diagramm im Anhang.

Methodengenauigkeit – CD34+ Absolutzahl (Zellen/ μ L)

Siehe Diagramm im Anhang.

Methodengenauigkeit – Leukozytengesamtzahl – CD45+ (Zellen/ μ L)

Siehe Diagramm im Anhang.

Genauigkeit der Methode (automatische ggü. manuelle Ergebnisse)

Der Grad der Messgenauigkeit zwischen der automatisierten und manuellen Methode des stemONE Systems wurde an vier externen Studienstandorten mit Proben mit frischem peripheren Vollblut, frischer oder aufgetauter Apherese, Nabelschnurblut und Knochenmark untersucht. Die Konfidenzintervalle (CI) wurden mit einem Konfidenzniveau von 95 % berechnet.

Proben mit frischem peripheren Vollblut (n = 59 von drei Standorten), frischen Apherese-Produkten (n = 51 von drei Standorten), frischem Nabelschnurblut (n = 29 von zwei Standorten), frischem Knochenmark (n = 33 von zwei Standorten), aufgetauten Apherese-Produkten (n = 23 von einem Standort), aufgetautem Nabelschnurblut (n = 31 von zwei Standorten) und aufgetautem Knochenmark (n = 20 von einem Standort) wurden gemäß der Packungsbeilage der Stem-Kit-Reagenzien aufbereitet und mit den COULTER EPICS XL/XL-MCL Durchflusszytometern analysiert. Ein automatisiertes Gating und eine automatisierte Analyse wurden durchgeführt, um die Werte für CD45+, CD34+ und CD34 % zu erhalten.

Methodengenauigkeit (Abbildungen)

FrISChe, periphere Vollblutproben (n = 59)

Siehe Diagramm im Anhang.

FrISChe Apherese-Proben (n = 51)

Siehe Diagramm im Anhang.

FrISChe Nabelschnurblut-Proben (n = 29)

Siehe Diagramm im Anhang.

FrISChe Knochenmarkproben (n = 33)

Siehe Diagramm im Anhang.

Aufgetaute Apherese-Proben (n = 23)

Siehe Diagramm im Anhang.

Aufgetaute Nabelschnurblut-Proben (n = 31)

Siehe Diagramm im Anhang.

Aufgetaute Knochenmarkproben (n = 20)

Siehe Diagramm im Anhang.

Präzision

Laborinterne Präzision

Die Studien wurden in einer klinischen Einrichtung mit drei unterschiedlichen Labormitarbeitern durchgeführt, wobei jeder ein anderes Durchflusszytometer benutzte. Drei Proben, die den dynamischen Bereich (0–2000 Zellen/ μ L) von CD34+ repräsentieren, wurden identifiziert:

Niedriger Bereich: frisches, mobilisiertes peripheres Blut
Mittlerer Bereich: Apherese-Produkt
Hoher Bereich: Apherese-Produkt

Diese Proben wurden in drei Aliquote aufgeteilt und jedem der drei Labormitarbeiter wurde ein Aliquot je Bereich (niedrig, mittel, hoch) zur Verfügung gestellt. Die Proben (n = 10) wurden gemäß der Packungsbeilage der Stem-Kit-Reagenzien für jedes Aliquot vorbereitet. Jeder Labormitarbeiter führte eine Analyse auf einem EPICS XL Durchflusszytometer mit automatischem und manuellem Gating und Analyse durch, um die Werte für CD45+, CD34+ und CD34 % zu erhalten. Die Werte werden als Prozentzahl (%) der gesamten Leukozytenzahl und als Absolutzahl (Zellen/ μ L) angegeben.

Die Ergebnisse der laborinternen Präzisionsstudie werden in den folgenden Tabellen nach Bereich geordnet dargestellt. Die Werte, die für die Absolutzahlen von CD45+ und CD34+ sowie für die Prozentzahl von CD34 ermittelt wurden, zeigen eine geringe Variation, wie durch die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für diese Wiederholungsmessung nachgewiesen. Siehe Diagramm im Anhang.

Laborinterne Präzision

Proben, die den dynamischen Bereich des Assays abdecken, wurden mit frischem peripheren Vollblut, frischem Knochenmark, frischen und aufgetauten Apherese-Produkten und Nabelschnurblut von vier externen Untersuchungsstandorten erhalten. Es wurden jeweils zehn Proben gemäß der Packungsbeilage der Stem-Kit-Reagenzien aufbereitet und mit den COULTER EPICS XL/XL-MCL Durchflusszytometern mit manuellem Gating und manueller Analyse untersucht, um die Werte CD45+, CD34+ und CD34 % zu ermitteln.

Die in den folgenden Tabellen für CD45+, CD34+ und CD34 % angegebenen Werte zeigen, dass die Analysemethode reproduzierbar ist, wie durch die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für diese Messung nachgewiesen. Die Datentabellen im ANHANG zeigen die laborinterne Präzision des Assays. Siehe Diagramm im Anhang.

EINSCHRÄNKUNGEN

Informationen zu den Einschränkungen bei Verwendung der automatisierten Methode sind im stemCXP System Guide (System-Handbuch) der stemCXP-Systemsoftware enthalten.

- Gefärbte und lysierte Proben müssen auf Eis gelagert und gemäß den Informationen im Abschnitt „Stabilität aufbereiteter Proben“ auf dem Durchflusszytometer analysiert werden. Andernfalls können fehlerhafte Ergebnisse auftreten.
- Die Reagenzien nicht verdünnen, aliquotieren oder einfrieren. Nur wie in der Verpackung verwenden.
- Die Reagenzien sind ausschließlich für die Durchflusszytometrie bestimmt.
- Eingefrorene Proben ordnungsgemäß auftauen, um eine optimale Färbung zu gewährleisten.
- Unter folgenden Bedingungen können möglicherweise nicht alle roten Erythrozyten lysiert werden: Vorhandensein von kernhaltigen Erythrozyten, abnorme Proteinkonzentration oder Hämoglobinopathien. Dies kann zu fälschlicherweise verringerten CD34 %-Ergebnissen führen, da die unlysierten Erythrozyten als Leukozyten gezählt werden. Die Absolutzahlen von CD34+ und CD45+ sollten nicht beeinträchtigt sein.
- Bestimmte Patienten können aufgrund der Alterung oder der sehr geringen Anzahl bestimmter Zellpopulationen besondere Problemfälle darstellen.
- Die mit der Durchflusszytometrie erzielten Ergebnisse können fehlerhaft sein, wenn die Gates nicht ordnungsgemäß festgelegt wurden.
- Die Stem-Kit-Reagenzien wurden zur Verwendung mit dem 7-AAD Viability Dye-Vitalitätsfarbstoff entwickelt, um lebensfähige HPC zu ermitteln. Wenn Ihr Labor eine alternative Methode zur Bestimmung der Viabilität einsetzt, sind die allgemeinen Regeln der guten Laborpraxis und die laborinternen Verfahren zur Qualitätskontrolle zu befolgen, um die Qualität der Ergebnisse sicherzustellen.

MARKEN

Beckman Coulter, das stilisierte Logo und die in diesem Dokument erwähnten Beckman Coulter-Produkt- und Dienstleistungsmarken sind in den USA und anderen Ländern Marken oder eingetragene Marken von Beckman Coulter, Inc.

WEITERE INFORMATIONEN

www.beckmancoulter.com

Liste der Symbole

Das Glossar der Symbole ist auf beckman.com/techdocs (Dokumentnummer B60062) verfügbar.

Reagenti de Stem-Kit

REF IM3630 50 test

Per uso diagnostico *in vitro*

USO PREVISTO

I reagenti Stem-Kit sono composti da un reagente bi-colore fluorescente (FITC, PE) con anticorpi monoclonali murini, un controllo bi-colore murino fluorescente (FITC, PE) IsoClonic, un reagente per la conta assoluta, un reagente per la vitalità cellulare e un reagente di lisi. È pensato “per uso diagnostico in vitro” per l’identificazione e l’enumerazione simultanee delle percentuali delle popolazioni cellulari CD45+ e CD45+ CD34+ a doppia positività e per le conte assolute nei campioni biologici mediante citometria a flusso. I campioni biologici includono sangue intero periferico normale o mobilizzato e prodotti di aferesi, sangue del cordone ombelicale e midollo osseo freschi o congelati. È possibile ottenere le misurazioni delle popolazioni cellulari utilizzando il metodo automatico o manuale per il gating e l’analisi.

Per istruzioni complete in caso di impiego del metodo manuale, consultare le presenti istruzioni accluse alla confezione di Stem-Kit Reagents. Per istruzioni complete nel caso si utilizzi il metodo automatizzato, fare riferimento alla stemCXP System Guide (Guida al sistema stemCXP) in dotazione al kit software stemCXP 2.0 e stemCXP versione 2.0, WIN 7.

RIEPILOGO

Cellule progenitrici ematopoietiche (HPC)

I reagenti Stem-Kit sono studiati per individuare le cellule progenitrici ematopoietiche umane (HPC) utilizzando i criteri seguenti: “Le reali cellule CD34+ (a) esprimono l’antigene CD34, (b) esprimono l’antigene CD45 con blasti dalla colorazione intensa (ovvero subito rilevabili, ma a livelli inferiori rispetto a linfociti e monociti) e (c) presentano caratteristiche dei blasti con scatter della luce dell’angolo laterale basso e dell’angolo frontale da basso a intermedio” (1). L’esclusione di CD34+ HPC morte dall’enumerazione di CD34+ HPC vitali viene ottenuta utilizzando il colorante di vitalità 7-AAD (2).

CD34

L’antigene CD34 fa parte di una famiglia di glicoproteine transmembranalì a catena singola differentemente glicosilate di tipo I (3, 4, 5). Si esprime praticamente su tutte le cellule progenitrici ematopoietiche incluse le cellule staminali multipotenti. Gli epitopi CD34 sono stati suddivisi in tre classi in base alla sensibilità alla neuraminidasi e alla glicoproteasi della pasteurizzazione (6). L’anticorpo monoclonale CD34 (mAb) utilizzato nei reagenti Stem-Kit si chiama 581. Riconosce nello specifico un epitopo di classe III della molecola CD34 (7) come definito dai modelli di clivaggio enzimatico (6, 8). L’anticorpo monoclonale 581 è stato assegnato a CD34 nel corso del 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5° workshop HLDA sugli antigeni di differenziazione dei leucociti umani), tenutosi a Boston, Massachusetts, USA, nel 1993 (7).

CD45

L’anticorpo CD45 riconosce i membri della famiglia CD45 degli antigeni panleucocitari con peso molecolare di 180, 190, 210 e 220 kD (9, 10, 11). È noto anche come antigene comune del leucocita (LCA). L’antigene CD45 viene espresso su ogni tipo di cellula ematopoietica, tranne che sugli eritrociti maturi e le loro progenitrici più vicine (11, 12). Non è stato identificato nel tessuto non ematopoietico differenziato (12, 13, 14, 15). CD45 mAb utilizzato nei reagenti Stem-Kit si chiama J33. È stato assegnato a CD45 durante il 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (III Workshop HLDA sugli antigeni di differenziazione dei leucociti umani), tenutosi a Oxford, Inghilterra, nel 1986 (16).

7-AAD

Il colorante di vitalità 7-amino-actinomicina D (7-AAD) è simile alla actinomicina D che contiene un gruppo di aminoacidi sostituito nella settima posizione del cromoforo. Il colorante di vitalità 7-AAD si interpone tra le basi di citosina e guanina del DNA (15). Le actinomicine sono composti biologicamente attivi contenenti 2-amino-4, 6 dimetilfenossazone-3 cromoforo e due pentapeptidi ciclici (17). Le actinomicine formano complessi stabili con l’acido deossiribonucleico a doppia elica (DNA) ma non con l’acido ribonucleico a doppia elica (RNA), né con ibridi RNA-DNA o con DNA o RNA a singola elica (15, 18).

Le proprietà spettrali del colorante di vitalità 7-AAD rendono questa molecola particolarmente adatta all’analisi in citometria a flusso (17). Il massimo assorbimento del complesso 7-AAD/DNA si trova nella regione spettrale verde e, di conseguenza, risulta idonea per un citometro dotato di laser ad argon (lunghezza d’onda dell’eccitazione pari a 488 nm) (15). L’emissione a fluorescenza rossa del colorante di vitalità 7-AAD (da 635 a 675 nm) facilita l’uso di questa sonda in combinazione con gli anticorpi coniugati di isotiocianato di fluorescina (FITC) e ficoeritrina (PE) perché, a differenza dello ioduro di propidio (PI), il complesso 7-AAD/DNA presenta una sovrapposizione spettrale minima con FITC e PE (17).

Le cellule apoptotiche, necrotiche e/o le cellule danneggiate sono fonti di interferenza nell’analisi delle cellule vitali mediante citometria a flusso. Le cellule non vitali devono essere valutate e distinte focalizzandosi sulla colorazione positiva di 7-AAD quando le cellule vitali restano non colorate (negative) (19).

Sistemi di citometria a flusso

I sistemi di citometria a flusso (FC 500) applicano i principi della citometria a flusso per analizzare campioni biologici allo scopo di identificare varie popolazioni cellulari determinate dagli specifici anticorpi monoclonali e fluorocromi usati. Il presente test utilizza i sistemi di citometria a flusso FC 500 dotati del software di sistema CXP per analizzare i campioni.

PRINCIPIO

Questo test dipende dalla capacità di un anticorpo monoclonale di legarsi alla superficie delle cellule che esprimono i diversi determinanti antigenici cellulari. Il reagente CD45-FITC / CD34-PE presenti nei reagenti Stem-Kit rappresenta una combinazione di due anticorpi monoclonali murini, ognuno coniugato a uno specifico fluorocromo e specifico per un diverso antigene di superficie cellulare. La colorazione della superficie cellulare specifica viene eseguita incubando i campioni duplicati di un campione biologico con il reagente bi-colore CD45-FITC / CD34-PE.

Un test aggiuntivo dello stesso campione viene colorato con il reagente CD45-FITC / IsoClonic Control-PE per controllare il legame non specifico dell'anticorpo monoclonale CD34-PE. Il colorante di vitalità 7-AAD, un colorante di acidi nucleici che si lega a coppie di basi accessibili (DNA cellulare), viene utilizzato per contraddistinguere le cellule vitali da quelle non vitali. Gli eritrociti di ciascun campione vengono lisati con la Lysing Solution (soluzione lisante) NH₄Cl preparata a 1X. Stem-Count Fluorospheres o Flow-Count Fluorospheres (reagenti per la conta assoluta) vengono aggiunti e le cellule restanti vengono analizzate mediante citometria a flusso. Il controllo del processo e il controllo di qualità del dosaggio vengono eseguiti dallo strumento e dai reagenti del controllo di qualità dei campioni: Flow-Check Fluorospheres, Flow-Set Fluorospheres, gli opportuni reagenti di compensazione e Stem-Trol Control Cells.

ESEMPI DI APPLICAZIONI CLINICHE

Dalla cronologia dei report scientifici sulle cellule progenitrici ematopoietiche (HPC) emerge che i primi studi si affidavano alle conte delle cellule nucleate per la quantificazione. Gli studi successivi che hanno coinvolto i dosaggi per unità formante colonie (CFU) hanno fornito indicazioni approssimative sulle popolazioni di cellule progenitrici. I dosaggi per CFU dispendiosi in termini di tempo hanno portato alla scoperta della molecola della superficie cellulare CD34. La presenza di CD34 è stata rilevata sulla superficie delle cellule ematopoietiche precoci e delle cellule ematopoietiche formanti colonie del midollo osseo e del sangue periferico (20). In seguito, sono stato sviluppati e utilizzati nella citometria a flusso gli anticorpi monoclonali diretti contro la molecola CD34. Le determinazioni di CD34 mediante citometria a flusso sono attualmente ampiamente riconosciute come mezzi utili alla valutazione delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche.

Nel midollo osseo di soggetti sani, dall'1 al 3% di cellule che esprimono l'antigene CD34 è in grado di ricostituire l'emotopoiesi di più linee a lungo termine (3, 20). Nel sangue periferico di soggetti sani, meno dello 0,1% di cellule in circolazione esprime l'antigene CD34 (1, 21). L'uso dei reagenti Stem-Kit offre un metodo di citometria a flusso semplice, rapido e sensibile per il rilevamento delle cellule progenitrici ematopoietiche e delle cellule staminali nel sangue periferico, nei prodotti di leucaferesi, nel midollo osseo e nel sangue del cordone ombelicale.

CONTENUTO DEL REAGENTE

I reagenti Stem-Kit contengono quanto segue:

- Reagente CD45-FITC / CD34-PE (45/34): 1 fiala.
 - Reagente CD45-FITC / IsoClonic Control-PE (45/CTRL): 1 fiala.
 - Fluorosfere Stem-Count: 1 fiala.
 - Colorante di vitalità 7-AAD: 1 fiala.
 - Lysing Solution (soluzione lisante) NH₄CL 10X: 2 fiale.
1. È necessario utilizzare questi reagenti così come forniti nel kit.

Le fluorosfere Flow-Count, simili alle fluorosfere Stem-Count, possono essere utilizzate per la determinazione della conta assoluta se si utilizza la concentrazione nominale specifica.

2. CD45-FITC / CD34-PE è un reagente bi-colore pronto all'uso fornito in 2,2 mL di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) contenente 2 mg/mL di albumina sierica bovina (BSA) e lo 0,1% di sodio azide come conservante.
3. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE è un reagente bi-colore pronto all'uso fornito in 1,2 mL di PBS contenente 2 mg/mL di BSA e lo 0,1% di sodio azide come conservante. Il reagente CD45-FITC / IsoClonic Control-PE è una miscela di anticorpo monoclonale 581 non coniugato e coniugato con PE (analogamente a CD34). Questa miscela agisce come controllo isomorfologico appropriato con cui verificare il legame non specifico di CD34-PE mAb su ciascun campione.

NOTA: I reagenti CD45-FITC / CD34-PE e CD45-FITC / IsoClonic Control-PE non devono essere separati. Dopo aver effettuato i test e i controlli, verificare che entrambi i reagenti abbiano lo stesso numero di lotto sull'etichetta della fiala.

Riepilogo delle caratteristiche degli anticorpi

Specificità	CD45	CD34
Clone	J33	581
Ibridoma	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogeno	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Catena Ig	Catene leggere IgG1, κ	Catene leggere IgG1, κ
Specie	Topo	Topo
combinazione	Isotiocianato di fluoresceina (FITC)	R-ficoeritrina (PE)

Specificità	CD45	CD34
Rapporto molare	5–8 moli FITC/mole Ig	0,5–1,5 moli PE/mole Ig
Lunghezza d'onda di eccitazione	488 nM (blu-verde)	488 nM (blu-verde)
Emissione di fluorescenza	Da 504 a 541 nm (soprattutto verde)	Da 568 a 590 nm (soprattutto arancione)

- Le fluorosfere Stem-Count o le fluorosfere Flow-Count sono costituite da 10 µm (diametro nominale) di microsfele fluorescenti di polistirene in 20 mL di sospensione acquosa contenente un tensioattivo e l'1% di formaldeide. Ogni fluorosfera contiene un colorante che ha un intervallo di emissione di fluorescenza compreso tra 525 nm e 700 nm quando è eccitata a 488 nm. La concentrazione nominale delle fluorosfere Stem-Count o delle fluorosfere Flow-Count (fluorosfere/µL) deriva da molteplici analisi ripetute utilizzando un analizzatore di dimensioni delle particelle COULTER. Il valore specifico del lotto viene indicato sull'etichetta della fiala.
- Il colorante di vitalità 7-AAD viene fornito in una soluzione salina tamponata con fosfato al 99% (PBS: fosfato di sodio 0,01 M, cloruro di sodio 0,145 M, pH 7,2), con dimetilsolfossido (DMSO) all'1%.
- La Lysing Solution (soluzione lisante) NH₄Cl viene fornita sotto forma di 20 mL di soluzione concentrata 10X. Contiene una miscela di cloruro di ammonio (NH₄Cl), bicarbonato di potassio (KHCO₂), acido etilendiamminotetraacetico disodico (EDTA).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Le preparazioni degli anticorpi monoclonali contengono sodio azide allo 0,1%. In condizioni di acidità, il sodio azide produce acido azotidrico, un composto estremamente tossico. È possibile smaltirlo nella rete fognaria insieme a un'ingente quantità di acqua corrente per evitare l'accumulo pericoloso nelle tubature di metallo e potenziali esplosioni.
- Ogni campione o prelievo nonché qualsiasi materiale che entri in contatto con quest'ultimo deve essere manipolato come una sostanza potenzialmente infettiva ed eliminata adottando le opportune precauzioni.
- Non pipettare mai usando la bocca ed evitare il contatto dei campioni o dei reagenti con la pelle e le membrane mucose.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza presente sull'etichetta della fiala.
- Le fluorosfere Stem-Count o le fluorosfere Flow-Count contengono l'1% di formaldeide. Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle in quanto la formaldeide può causare effetti irreversibili per tali tessuti. Non respirare i vapori. Indossare dispositivi di sicurezza adeguati quali guanti e una protezione per gli occhi.
- Non esporre i reagenti Stem-Kit a luce diretta o fonti di calore durante la conservazione o l'uso.
- Evitare l'evaporazione o la perdita di fluorosfere Stem-Count o fluorosfere Flow-Count, altrimenti potrebbero verificarsi risultati errati. Tappare saldamente le fiale dopo l'uso e conservarle in posizione verticale.
- Verificare che le fluorosfere vengano completamente risospese prima dell'uso. Evitare l'eccessiva miscelazione per ridurre al minimo la formazione di bolle d'aria. Non pipettare le bolle d'aria per evitare il verificarsi di risultati errati.
- Utilizzare una pipetta calibrata (meglio se una pipetta di spostamento o di ripetizione positiva) per erogare i campioni e le fluorosfere Stem-Count o le fluorosfere Flow-Count, altrimenti potrebbero verificarsi risultati errati.
- Utilizzare tecniche di pipettatura consigliate dal produttore di pipette per garantire una pipettatura accurata e precisa di campioni e fluorosfere Stem-Count o fluorosfere Flow-Count, altrimenti è possibile che vengano generati risultati errati.
- I campioni colorati e lisati devono essere conservati su ghiaccio e analizzati sul citometro a flusso secondo le informazioni fornite nella sezione "Stabilità del campione elaborato", altrimenti potrebbero verificarsi risultati errati.
- Verificare che vengano contate almeno 1.000 fluorosfere Stem-Count o fluorosfere Flow-Count e che non si verifichi la conversione automatica dei risultati in conte assolute.
- Ogni lotto di fluorosfere Stem-Count o fluorosfere Flow-Count possiede una concentrazione specifica di fluorosfere. Quando si calcolano i risultati della conta assoluta, assicurarsi che venga utilizzata la concentrazione nominale corretta.
- Non utilizzare metodi di preparazione che richiedono una fase di lavaggio a causa di una perdita sconosciuta di cellule.
- L'impiego dell'incubazione o dei tempi di miscelazione, nonché di temperature diverse da quelle specificate, può comportare risultati errati.
- Il colorante di vitalità 7-AAD contiene lo 0,005% di 7-AAD. 7-AAD puro è un potenziale cancerogeno. Sebbene questo composto sia altamente diluito, consigliamo di evitare il contatto con la pelle e gli occhi, di indossare indumenti e guanti protettivi adatti, nonché occhiali e mascherine protettivi.
- Il colorante di vitalità 7-AAD contiene l'1% di dimetilsolfossido (DMSO). Il DMSO puro è irritante. Sebbene questo composto sia diluito, consigliamo di evitare il contatto con la pelle e gli occhi, di indossare indumenti e guanti protettivi adatti, nonché occhiali e mascherine protettivi.

18. Essendo un cromoforo, 7-AAD è sensibile alla luce. Conservare il colorante di vitalità 7-AAD all'interno dell'imballaggio di cartone del kit per evitare la costante esposizione alla luce durante la conservazione.
19. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce dei campioni miscelati durante l'incubazione.
20. Utilizzare buone pratiche di laboratorio generali quando si maneggiano i reagenti.

CLASSIFICAZIONE DEI PERICOLI GHS

Fluorosfere Stem-Count

PERICOLO



H316

Provoca leggera irritazione cutanea.

H317

Può provocare una reazione allergica cutanea.

H350

Può provocare il cancro.

P201

Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

P280

Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.

P308+P313

IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.

P333+P313

In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364

Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Formaldeide 0,5 - 1,0%
miscela di: 5-cloro-2-metil
- 4-isotiazol-3-one [n. CE 247-500-7];
2-metil-4-isotiazol-3-one [n. CE
220-239-6] (3:1) < 0,05%

7-AAD - Colorante di vitalità cellulare

ATTENZIONE

H316

Provoca leggera irritazione cutanea.

P332+P313

In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

Dimetilsolfossido 0,5 - 2%



La scheda tecnica sulla sicurezza è disponibile all'indirizzo beckman.com/techdocs

CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il reagente chiuso è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla fiala se conservato a una temperatura di 2–8 °C al riparo dalla luce. Non utilizzare dopo la data di scadenza. Non congelare. I reagenti Stem-Kit restano stabili per 30 giorni dopo l'apertura della fiala di fluorosfere Stem-Count o fluorosfere Flow-Count. Le fiale aperte devono essere ritappate subito dopo l'uso e conservate a una temperatura di 2–8 °C al riparo dalla luce. NON effettuare l'aliquotazione delle fluorosfere Stem-Count o delle fluorosfere Flow-Count dalla fiala originale.

IMPORTANTE: Rischio di risultati errati in caso di perdita delle fluorosfere Stem-Count o delle fluorosfere Flow-Count. Una volta aperte, le fluorosfere Stem-Count o le fluorosfere Flow-Count vanno conservate in posizione verticale in modo da evitare la possibilità di perdite. Non utilizzare i reagenti in caso di eventuali perdite.

Segni di deterioramento

Segni di deterioramento possono presentarsi nelle situazioni seguenti:

Reagenti Stem-Kit, ad eccezione di fluorosfere Stem-Count

- Modifica dell'aspetto normale come indicato di seguito

Reagente	Aspetto normale
CD45-FITC / CD34-PE	Liquido trasparente, leggermente rosato
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Liquido da trasparente a leggermente rosato

Reagente	Aspetto normale
7-AAD - Colorante di vitalità cellulare	Liquido trasparente, leggermente rosato tendente al rosso
Lysing Solution (soluzione lisante) NH ₄ CL	Liquido trasparente, incolore

Stem-Count Fluorospheres

- L'aspetto, nel corso dell'acquisizione, di popolazioni fluorescenti secondarie contenenti più del 20% della popolazione totale di fluorosfere.
- Un'importante variazione dei valori ottenuti per le conte o i campioni.

IMPORTANTE: I reagenti non vanno utilizzati in presenza di segni di deterioramento, per evitare di ottenere risultati errati. In caso di segni di deterioramento, contattare il rappresentante Beckman Coulter di zona.

Preparazione del reagente

1. I reagenti bi-colore CD45-FITC / CD34-PE e CD45-FITC / IsoClonic Control-PE vengono prelevati direttamente dalle fiale senza alcuna diluizione.
2. Le fluorosfere Stem-Count o le fluorosfere Flow-Count vengono utilizzate direttamente dalla fiala senza diluizione. Tutto l'alluminio della sigillatura termica va rimosso dalla sommità del flacone alla prima apertura. È necessario eseguire la corretta miscelazione. La prima volta che vengono manipolate le fiale di fluorosfere Stem-Count o le fluorosfere Flow-Count all'inizio della giornata, agitare per 3–5 secondi.

Prima di effettuare la pipettatura dalla fiala, miscelare delicatamente capovolgendo la fiala per 3–5 volte.

Agitare la fiala con fluorosfere a inizio giornata, quindi conservarla a una temperatura di 2–8 °C finché non viene utilizzata.

Evitare l'evaporazione e la perdita tappando saldamente la fiala dopo l'uso.

3. Il colorante di vitalità 7-AAD viene utilizzato direttamente dalla fiala senza diluizione.
4. È necessario preparare quotidianamente una Lysing Solution (soluzione lisante) 1X NH₄Cl: aggiungere nove volumi di acqua deionizzata a un volume di Lysing Solution (soluzione lisante) NH₄Cl concentrata 10X. Non refrigerare. Gettare la Lysing Solution (soluzione lisante) 1X NH₄Cl inutilizzata a fine giornata.

Prima dell'uso, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18–25 °C).

MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Requisiti dei campioni

Riepilogo sulla manipolazione campioni:

Tipo di campione	Metodo di gating	Temperatura di stoccaggio	Età del campione
Aferesi	Algoritmo	2–8 °C	24 ore
	Manuale	2–8 °C	24 ore
Midollo osseo	Algoritmo	2–8 °C	24 ore
	Manuale	2–8 °C	24 ore
Sangue del cordone ombelicale	Algoritmo	18–25 °C	24 ore
	Manuale	18–25 °C	24 ore
Sangue intero normale	Algoritmo	18–25 °C	20 ore
	Manuale	18–25 °C	20 ore
Sangue intero mobilizzato	Algoritmo	18–25 °C	20 ore
	Manuale	18–25 °C	20 ore

1. I campioni biologici includono sangue intero periferico fresco normale o mobilizzato e prodotti di aferesi, sangue del cordone ombelicale e midollo osseo freschi o congelati.
2. Con il metodo di gating manuale è possibile analizzare solo le cellule progenitrici ematopoietiche (HPC) manipolate o purificate.
3. Raccogliere asetticamente i prodotti di aferesi, i campioni di sangue periferico, di sangue del cordone ombelicale o di midollo osseo in una provetta sterile di raccolta del sangue sottovuoto con anticoagulante ACD formula A o K3 EDTA.
4. I campioni di sangue intero e di sangue intero mobilizzato raccolti in provette anticoagulanti possono essere conservati fino a 20 ore a temperatura ambiente (18–25 °C) prima della colorazione.

5. I campioni di sangue del cordone ombelicale raccolti in provette anticoagulanti possono essere conservati fino a 24 ore a temperatura ambiente (18–25 °C) prima della colorazione.
6. I prodotti di aferesi e i campioni di midollo osseo raccolti possono essere conservati fino a 24 ore a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C prima della colorazione.
7. Prima della preparazione del campione, verificare che la concentrazione di leucociti (WBC) non sia superiore a 30×10^9 cellule WBC/L. Se necessario, diluire il campione con HBSS o equivalente per ottenere un valore medio di 15×10^9 cellule WBC/L. Registrare il fattore di diluizione per il calcolo della conta assoluta HPC finale.
8. Le basse concentrazioni di proteine possono comportare la formazione di aggregati di fluorosfere Stem-Count o fluorosfere Flow-Count e generare conte cellulari assolute erroneamente elevate. È necessario diluire i campioni a bassa concentrazione di proteine con un tampone arricchito di proteine.
9. È necessario elaborare tutti i campioni con i reagenti Stem-Kit incluso il colorante di vitalità 7-AAD.

Procedura per il Trattamento dei Campioni

Eseguire i test in duplicato, attenendosi a “The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry” (Linee guida ISHAGE per la determinazione cellulare mediante citometria a flusso) (1).

NOTA: Per istruzioni complete sull'elaborazione delle cellule di controllo Stem-Trol in caso di impiego del metodo manuale, consultare le istruzioni accluse alla confezione delle cellule di controllo Stem-Trol. In alternativa, se viene utilizzato il metodo di analisi stemONE, fare riferimento a stemONE System Guide (Guida al sistema stemONE) o a stemCXP System Guide (Guida al sistema stemCXP) in dotazione al software di sistema stemCXP per istruzioni complete.

1. Per ciascun campione, etichettare tre provette come segue:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipettare 20 µL di reagente CD45-FITC / CD34-PE nelle provette: 45/34/7-AAD #1 e 45/34/7-AAD #2.
3. Pipettare nella provetta 20 µL di reagente CD45-FITC / IsoClonic Control-PE: 45/CTRL/7-AAD.
4. Pipettare in tutte le provette 20 µL di colorante di vitalità 7-AAD.

IMPORTANTE: Se il campione di sangue resta nella parte superiore o laterale della provetta test, potrebbe verificarsi il rischio di lisi incompleta. Fare attenzione durante la pipettatura onde evitare che il sangue tocchi la parte superiore o laterale della provetta test. Per rimuovere tutte le tracce del campione di sangue dalla parte superiore o laterale della provetta test, se necessario, pulire la provetta con un tampone di cotone.

5. Utilizzando una pipetta di spostamento o una pipetta di ripetizione positiva, pipettare 100 µL di campione paziente nella provetta.
6. Vortexare immediatamente la provetta per 5 secondi.
7. Incubare tutte le provette a temperatura ambiente (18–25 °C) per 20 minuti, al riparo dalla luce.
8. Dopo l'incubazione, aggiungere in ciascuna provetta 2 mL di Lysing Solution (soluzione lisante) 1X NH₄Cl preparata e agitare immediatamente per 5 secondi.

NOTA: Per dettagli sulla preparazione della Lysing Solution (soluzione lisante), consultare la sezione 7.2 “PREPARAZIONE DEL REAGENTE” qui sopra.

IMPORTANTE: Rischio di ottenere risultati errati in caso di pipettatura di bolle d'aria. La miscelazione eccessiva delle fluorosfere Stem-Count o delle fluorosfere Flow-Count potrebbe comportare la formazione di bolle d'aria. Evitare l'eccessiva miscelazione delle fluorosfere Stem-Count o delle fluorosfere Flow-Count e non pipettare bolle d'aria nelle provette campione.

9. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti, al riparo dalla luce.
10. Miscelare delicatamente le fluorosfere Stem-Count o le fluorosfere Flow-Count capovolgendo la fiala 3–5 volte prima dell'uso.
11. Prima dell'acquisizione, e subito dopo il passaggio 9, utilizzare una provetta di spostamento o di ripetizione positiva per pipettare 100 µL di fluorosfere Stem-Count o fluorosfere Flow-Count in ognuna delle tre provette.
12. Agitare subito ciascuna provetta per 5 secondi.

NOTA: Per dettagli sulla preparazione della Lysing Solution (soluzione lisante), consultare la sezione 7.2 “PREPARAZIONE DEL REAGENTE” qui sopra.

Riepilogo colorazione campioni

Reagenti/Campioni	45/34/7-AAD #1	Etichetta della provetta test 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD - Colorante di vitalità cellulare	20 µL	20 µL	20 µL
Campione	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare - Incubare a temperatura ambiente per 20 minuti. Proteggere dalla luce.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Agitare – Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Proteggere dalla luce.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare su vortex			
Per i prodotti di aferesi, i campioni di sangue del cordone ombelicale e i campioni di midollo osseo raccolti, non attendere più di 60 minuti in ghiaccio prima dell'acquisizione.			
Per i campioni di sangue intero e di sangue intero mobilizzato, non attendere più di 45 minuti in ghiaccio prima dell'acquisizione.			
Analizzare subito i campioni scongelati.			
proteggere dalla luce			

Stabilità del campione elaborato:

- Per i prodotti di aferesi, i campioni di sangue del cordone ombelicale e i campioni di midollo osseo raccolti, dopo l'aggiunta delle fluorosfere Stem-Count o Flow-Count, non attendere più di 60 minuti in ghiaccio prima dell'acquisizione.
- Per i campioni di sangue intero e di sangue intero mobilizzato, dopo l'aggiunta delle fluorosfere Stem-Count o Flow-Count non attendere più di 45 minuti in ghiaccio prima dell'acquisizione.
- Per i campioni congelati l'acquisizione dovrebbe avvenire immediatamente dopo l'aggiunta delle fluorosfere Stem-Count o Flow-Count.
- I campioni elaborati devono essere conservati su ghiaccio protetti dalla luce; durante l'acquisizione, limitare il più possibile l'esposizione a TA.

SOMMARIO

Il conservante sodio azide può formare composti esplosivi nelle tubazioni metalliche di scarico. Vedere il bollettino NIOSH: Explosive Azide Hazard (16/8/76) (Bollettino dell'Istituto Nazionale per la Sicurezza e la Salute sul Lavoro: Rischio di esplosione del sodio azide).

Per evitare il possibile accumulo di azidi, lavare i tubi di scarico con acqua dopo lo smaltimento del reagente puro. Il sodio azide deve essere eliminato conformemente alle normative locali applicabili.

COMPONENTI NECESSARI MA NON FORNITI CON IL KIT:

1. Acqua deionizzata.
2. Soluzione salina di Hank equilibrata (HBSS) o equivalente
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Alternativa a Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053).
9. Bagno di acqua gelata
10. Provette test di plastica (12 x 75 mm)
11. Pipetta di ripetizione calibrata (20 µL, 100 µL, 2 mL) e puntali o pipette di spostamento positive calibrate (20 µL, 100 µL, 2 mL) e puntali
12. Pipette standard multiscatto (20 µL, 100 µL, 2 mL) e puntali.
13. Agitatore di tipo Vortex.

14. Cronometro.
15. Citometro a flusso.
16. Kit software stemCXP 2.0, stemCXP versione 2.0, WIN 7, SOLO per analisi automatizzata di campioni su sistema di citometria a flusso FC 500 dotato di software CXP (versione 2.0).

RISULTATI

Configurazione del protocollo di analisi

Il citometro a flusso deve essere in grado di rilevare lo scatter frontale, lo scatter laterale e quattro canali di fluorescenza. Per il canale FL3 (per il monitoraggio delle fluorosfere Stem-Count o Flow-Count) utilizzare un filtro passa banda da 620 nm. Per il canale FL4 (per il monitoraggio del colorante di vitalità 7-AAD) utilizzare un filtro a passo lungo da 675 nm.

Verificare che il citometro a flusso sia correttamente allineato e standardizzato per l'intensità della fluorescenza.

Il citometro a flusso deve essere corretto accuratamente per le compensazioni di fluorescenza.

NOTA: Per l'analisi dei campioni, tutte le posizioni delle regioni sono approssimative fino al termine dell'acquisizione della provetta 45/34/7-AAD #1. Le regioni vengono ottimizzate in base al seguente protocollo e NON regolate per la seconda e la terza provetta nel pannello.

È necessario seguire una serie di 8 istogrammi e lo schema di determinazione del gate indicati per l'analisi dei campioni (vedere di seguito). È necessario seguire la stessa serie di 8 istogrammi e lo schema di determinazione del gate quando si utilizzano le cellule di controllo CD34+. Le regioni A, B, C e D (per la definizione della regione, consultare la sezione "Creazione delle regioni") devono essere adattate in modo che includano il cluster delle caratteristiche delle cellule di controllo CD34+.

Creazione degli Istogrammi:

Creare gli istogrammi come segue:

1. Creare l'istogramma 1 come FL1 CD45-FITC rispetto a scatter laterale.
2. Creare l'istogramma 2 come FL2 CD34-PE rispetto a scatter laterale.
3. Creare l'istogramma 3 come FL1 CD45-FITC rispetto a scatter laterale.
4. Creare l'istogramma 4 come scatter frontale rispetto a scatter laterale.
5. Creare l'istogramma 5 come FL1 CD45-FITC rispetto a FL2 CD34-PE.
6. Creare l'istogramma 6 come scatter frontale rispetto a scatter laterale.
7. Creare l'istogramma 7 come Tempo rispetto alle fluorosfere FL3 Stem-Count o Flow-Count.
8. Creare l'istogramma 8 come colorante di vitalità FL4 7-AAD rispetto a scatter laterale.

Gli istogrammi da 1 a 4 servono a caratterizzare le CD34+ HPC, una procedura che è possibile rimandare fino al momento dell'analisi. Questi primi quattro istogrammi vengono configurati secondo ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (Linee guida ISHAGE per la determinazione cellulare di CD34+ mediante citometria a flusso) (1, 2). Gli istogrammi da 5 a 7 servono a monitorare i parametri fondamentali nel corso dell'acquisizione. Questi parametri includono il discriminatore dello scatter frontale, il numero di eventi CD45+ da raccogliere e il corretto accumulo di singoletti di fluorosfere.

L'istogramma 8 serve a distinguere e analizzare gli eventi vitali dagli eventi non vitali.

Creazione delle Regioni

Creare le regioni come segue:

1. Istogramma 1. Creare una regione rettilinea A sull'istogramma 1 in modo da includere tutti i leucociti CD45+ ed eliminare le piastrine, i residui di eritrociti e gli aggregati.
2. Istogramma 1. Creare una regione amorfa E nell'istogramma 1 in modo da includere i linfociti (CD45 brillante, scatter laterale basso).
3. Istogramma 2. Creare una regione rettilinea B nell'istogramma 2 in modo da includere tutti gli eventi CD34+. Impostare un conteggio di arresto di 75.000 eventi (eventi CD45+) nell'istogramma 2.
4. Istogramma 3. Creare una regione amorfa C sull'istogramma 3 in modo da includere tutti gli eventi CD45dim raggruppati.
5. Istogramma 4. Creare una regione amorfa D sull'istogramma 4 in modo da includere tutti gli eventi raggruppati con scatter laterale intermedio e scatter frontale da intermedio a elevato.
6. Istogramma 5. Creare una regione Quadstat I sull'istogramma 5 per verificare il limite inferiore dell'espressione CD45 negli eventi CD34+.

- Istogramma 5. Creare una regione amorfa H sull'istogramma 5 per circondare tutte le fluorosfere Stem-Count o Flow-Count, inclusi i dipoli. La regione H deve trovarsi nell'angolo in alto a destra dell'istogramma 5.

NOTA: Accertarsi che la regione H sia disegnata come regione AMORPHOUS (Amorfa).

- Istogramma 5. Creare una regione rettilinea K (chiamata "listgate –" [elenco gate]) sull'istogramma 5. I confini della regione K sulla prima decade logaritmica dell'istogramma a due parametri. La regione K consente di eliminare gli eventi negativi doppi durante l'acquisizione al fine di analizzare 75.000 eventi relativi a CD45+.
- Istogramma 6. Copiare la regione D dall'istogramma 4 come regione F nell'istogramma 6.
- Istogramma 7. Creare una regione rettilinea G sull'istogramma 7 in modo da includere solo tutti i singoletti delle fluorosfere Stem-Count o fluorosfere Flow-Count. Per calcolare automaticamente i numeri assoluti di CD34+ HPC, è possibile etichettare la regione G come "CAL" (per maggiori dettagli, fare riferimento al manuale dello strumento).
- Istogramma 8. Creare una regione rettilinea J sull'istogramma 8 per includere i leucociti vitali (eventi negativi del colorante di vitalità 7-AAD).

Creazione delle Finestre di Analisi

Creare i gate come segue:

- Istogramma 1. Assegnare "J" all'istogramma 1 per visualizzare tutti gli eventi vitali. Se 7-AAD non viene utilizzato, assegnare la regione "-H" all'istogramma 1 per visualizzare tutti gli eventi ad eccezione delle fluorosfere Stem-Count o fluorosfere Flow-Count, inclusi i dipoli.
- Istogramma 2. Assegnare "AJ" ("A" se 7-AAD non viene utilizzato) all'istogramma 2 per visualizzare gli eventi CD34+ vitali (il totale se 7-AAD non viene utilizzato).
- Istogramma 3. Assegnare "A" e "B" e "J" ("A" e "B" se 7-AAD non viene utilizzato) all'istogramma 3 per visualizzare tutti gli eventi vitali CD45+/CD34+ (il totale se 7-AAD non viene utilizzato).
- Istogramma 4. Assegnare "A" e "B" e "C" e "J" ("A" e "B" e "C" se 7-AAD non viene utilizzato) all'istogramma 4 per visualizzare gli eventi vitali CD45+/CD34+ raggruppati (il totale se 7-AAD non viene utilizzato) con scatter laterale basso, escludendo le piastrine e i detriti. Gli eventi della regione ABCDJ sono reali CD34+ HPC vitali.
- Istogramma 5. Senza gate per visualizzare tutti gli eventi.
- Istogramma 6. Assegnare "EJ" ("E" se 7-AAD non viene utilizzato) all'istogramma 6 per visualizzare i linfociti vitali (il totale se 7-AAD non viene utilizzato) come controllo visivo sul discriminatore.
- Istogramma 7. Assegnare "H" all'istogramma 7 per visualizzare tutte le fluorosfere Stem-Count o Flow-Count, inclusi i dipoli.
- Istogramma 8. Assegnare "A" all'istogramma 8 per visualizzare gli eventi CD45+.

Configurazione del citometro a flusso

- Verificare che il citometro a flusso sia correttamente allineato e ottimizzato per lo scatter di luce e le intensità della fluorescenza dei rilevatori FL1, FL2, FL3 e FL4 secondo le linee guida del produttore e del laboratorio. Verificare che la compensazione del colore sia impostata per il funzionamento standard. Per maggiori istruzioni, fare riferimento al manuale dello strumento.
- Agitare le provette test per 5 secondi.
- Effettuare l'acquisizione dei dati nel citometro a flusso. È necessario analizzare almeno 75.000 eventi CD45+.
- Per l'analisi dei campioni: regolare il discriminatore e le regioni analizzando la provetta campione 45/34/7-AAD #1. Salvare il protocollo e analizzare le provette 45/34/7-AAD #2 e 45/CTRL/7-AAD senza ulteriori regolazioni.

Esempio di Analisi

Gli istogrammi riportati nell'APPENDICE vengono visualizzati in ordine ascendente come indicato nel protocollo.

Calcolo di CD34+ HPC per campione

Il numero di CD34+ HPC è calcolato come media dei risultati statistici della regione D per i due campioni duplicati (ad es. 45/34/7-AAD #1 e 45/34/7-AAD #2).

I risultati CD34+ HPC sono considerati validi se i risultati ottenuti dal reagente CD45-FITC / IsoClonic Control-PE sono inferiori del 10% rispetto ai risultati CD34+ HPC.

- La media dei risultati ottenuti dalle provette 45/34/7-AAD #1 e 45/34/7-AAD #2 per ciascun campione (ad es. media dei risultati stampati delle statistiche della regione D). È possibile che il numero di CD34+ HPC sia compreso nel 10% della media per i campioni duplicati. Il valore ottenuto con la provetta di controllo 45/CTRL/7-AAD deve rappresentare meno del 10% del valore medio ottenuto dalle provette test per convalidare i risultati

NOTE: Se la media della conta assoluta ottenuta per CD34+ HPC duplicato non è incluso nell'intervallo accettato (ad es. supera il 10%), stabilire se la pipettatura è stata eseguita correttamente, soprattutto per le fluorosfere Stem-Count o le fluorosfere Flow-Count. Verificare visivamente i report del citometro a flusso e la qualità delle procedure di colorazione e di lisi nelle provette test. Verificare in che modo sono stati definiti i confini delle regioni.

Se il valore ottenuto con 45/CTRL/7-AAD non rientra nell'intervallo di valori accettati (ad esempio supera del 10% la media della conta assoluta ottenuta per il duplicato), determinare se la pipettatura è stata eseguita correttamente, soprattutto per le fluorosfere Stem-Count o le fluorosfere Flow-Count. Verificare visivamente i report del citometro a flusso e la qualità delle procedure di colorazione e di lisi nelle provette test. Verificare in che modo sono stati definiti i confini delle regioni.

Se necessario, ripetere il passaggio di acquisizione con l'aggiunta di una provetta BLANK dopo la prima provetta duplicata 45/34/7-AAD #1 e #2 e prima della provetta 45/CTRL/7-AAD. Se necessario, ripetere l'intera preparazione con provette test nuove aggiungendo la provetta BLANK. Acquisire e analizzare sia la nuova serie di provette sia quella precedente. Confrontare i due risultati. In caso di discrepanza, contattare il rappresentante Beckman Coulter di zona.

2. Se il campione è stato diluito, il risultato ottenuto sopra DEVE essere moltiplicato per il fattore di diluizione (Dil) corretto. Il risultato finale ottenuto è la conta CD34+ HPC assoluta (cellule/ μ L).

Conta assoluta CD34+ HPC (cellule/ μ L) = risultato stampato della conta assoluta CD34+ HPC (cellule/ μ L) x Dil

3. Per i kit di aferesi, è possibile calcolare il numero totale di CD34+ HPC per confezione con la seguente formula:

Numero totale di CD34+ HPC per confezione = conta assoluta CD34+ HPC (cellule/ μ L) x 10^6 x volume confezione (L)

Dove:

4. Per la percentuale di CD34+ HPC all'interno del calcolo del valore dei leucociti CD45+, fare riferimento alla formula seguente:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Conta assoluta CD34+ HPC (cellule}/\mu\text{L)}}{\text{Conta assoluta di leucociti CD45+ (cellule}/\mu\text{L)}} \times 100$$

(ad es. risultati stampati della regione D) (ad es. risultati stampati della regione A)

CONTROLLO DI QUALITÀ

Assicurarsi che il citometro a flusso sia opportunamente allineato in base ai consigli del produttore, come indicato nei manuali dello strumento. Le intensità bersaglio sono state create per ottimizzare lo scatter della luce e le impostazioni dello strumento di fluorescenza per l'analisi di campioni colorati con il reagente con anticorpi monoclonali CD45-FITC / CD34-PE e il reagente CD45-FITC / IsoClonic Control-PE.

L'isotiocianato di fluorescina (FITC), la ficoeritrina (PE) e il colorante 7-amino-actinomicina D (7-AAD) dei fluorocromi presentano emissioni a diverse lunghezze d'onda ma presentano anche delle sovrapposizioni di spettro che vanno corrette mediante compensazione elettronica. Se si utilizza il software CXP, è possibile definire i livelli di compensazione ottimale analizzando, in un istogramma a due parametri, un campione di sangue intero corretto con Stem-Trol Control Cells colorate con il colorante di vitalità 7-AAD e con gli opportuni reagenti di compensazione. Nell'analisi, vengono effettuate regolazioni per assicurare che non si verifichi alcuna colorazione nel quadrante a doppia colorazione con i singoli fluorocromi.

Il colorante di vitalità 7-AAD (7-amino-actinomicina D) viene utilizzato per individuare le cellule non vitali mediante l'analisi in citometria a flusso per consentire l'enumerazione delle cellule vitali di interesse. Il colorante viene assorbito dalle cellule morte (eventi brillanti) che vengono quindi escluse dalle cellule vitali (eventi negativi) mediante gating (vedere istogramma 8).

Prima che i campioni vengano analizzati, un controllo dosato (cellule di controllo Stem-Trol) va sottoposto a colorazione per verificare la reattività anticorpale.

PRESTAZIONI

Le caratteristiche delle prestazioni fornite si basano sui reagenti Stem-Kit utilizzati con un citometro a flusso COULTER EPICS XL/XL-MCL con il software System II. Per esempi di prestazioni di FC 500 con il software CXP, consultare stemCXP System Guide (Guida al sistema stemCXP).

Valori previsti per intervalli di riferimento

I campioni di sangue intero normale (n = 117) sono stati prelevati da una popolazione di uomini (n = 58) e donne (n = 59) in modo da stabilire un intervallo di riferimento normale. Questo studio è stato eseguito in un sito di valutazione esterno. I test replicati per ciascun campione sono stati preparati in base alle istruzioni accluse alla confezione dei reagenti Stem-Kit. Sono stati eseguiti il gating e l'analisi manuali per ottenere i valori CD45+, CD34+ e CD34%.

L'analisi statistica suggerisce una distribuzione non gaussiana dei dati raccolti. Sulla base di tali riscontri, per l'analisi dei dati è stato utilizzato un (solido) approccio non parametrico. Sono stati ottenuti i valori CD45+, CD34+ e CD34%. I valori sono espressi in termini di conte assolute (cellule/ μ L) per CD45+ e CD34+ e di percentuale per la conta totale dei leucociti (CD34%) come mostrato nella tabella di seguito.

Sangue intero normale: intervallo di riferimento

Metodo manuale (analisi solida)	n	CD45+ (cellule/ μ L)				CD34+ (cellule/ μ L)				CD34+ (%)			
		Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD
Manuale	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Tali valori sono forniti unicamente a scopo indicativo. Ogni laboratorio deve definire i propri valori attesi a partire dalla popolazione locale di donatori normali.

Linearità

Le misurazioni ripetute sono state eseguite su ciascuna delle 10 diluizioni in serie per i 2 tipi di campione: sangue intero periferico corretto con CD34+ e sangue intero periferico mobilizzato fresco. Un intervallo dinamico compreso tra 0 e 2.000 cellule/ μ L e un intervallo di sensibilità a bassi livelli compreso tra 0 e 150 cellule/ μ L sono stati ottenuti per le concentrazioni di CD34+ HPC. I campioni sono stati preparati secondo le istruzioni accluse alla confezione dei reagenti Stem-Kit e analizzati con il citometro a flusso COULTER EPICS XL/XL-MCL. I valori sono espressi in termini di conta assoluta (cellule/ μ L). I risultati sono stati analizzati in termini di analisi di regressione lineare per le conte assolute attese rispetto a quelle ottenute per la media dei replicati meno le cellule endogene CD34+. Consultare le tabelle seguenti.

Le pendenze delle linee di regressione con i diagrammi per le conte assolute totali di CD34+ HPC mostrano la misura matematica della linearità. Ciò è supportato dalla distorsione minima potenziale del dosaggio come evidenziato dalle intercette per le analisi. Le conte assolute attese dimostrano un'elevata correlazione con le conte assolute ottenute.

Risultati del sangue intero corretto con CD34+

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Risultati del sangue periferico (mobilizzato)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Accuratezza del metodo (Tabelle)

(Risultati attesi rispetto a risultati ottenuti)

L'accuratezza del metodo è definita come il grado di accordo tra i risultati attesi e quelli ottenuti sia con il metodo di analisi e gating manuale sia con quello automatico. Il sangue intero periferico normale fresco è stato corretto con cellule CD34+ purificate a un livello 1.875 cellule/ μ L. Le conte delle cellule sono state confermate dall'emacitometro con vetrino di Malassez e diluite in serie con concentrazioni diverse. I risultati attestati vengono messi a confronto con i risultati ottenuti dalla media delle misurazioni duplicate utilizzando il gating e l'analisi automatici e manuali per ciascun livello di diluizione. Dai test della pendenza e delle ordinate sull'intercetta non emergono differenze statistiche tra il gating e l'analisi automatici e i risultati attesi, né tra il gating e l'analisi manuale e i risultati attesi.

Accuratezza del metodo - CD34+ (%)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Accuratezza del metodo - Conta assoluta di CD34+ (cellule/ μ L)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Accuratezza del metodo - Leucociti totali - CD45+ (cellule/ μ L)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Accuratezza del metodo (risultati automatici rispetto a risultati manuali)

Il grado di accuratezza tra i metodi automatico e manuale del sistema stemONE è stato studiato in quattro siti di valutazione esterni utilizzando sangue intero periferico fresco e campioni freschi o congelati di aferesi, sangue del cordone ombelicale e midollo osseo. Gli intervalli di confidenza (CI) sono stati calcolati con il 95% di limiti.

I campioni di sangue intero periferico fresco (n = 59 provenienti da tre siti), prodotti di aferesi freschi (n = 51 provenienti da tre siti), sangue del cordone ombelicale fresco (n = 29 provenienti da due siti), midollo osseo fresco (n = 33 provenienti da due

siti), prodotti di aferesi congelati (n = 23 provenienti da un sito), sangue del cordone ombelicale congelato (n = 31 proveniente da due siti) e midollo osseo congelato (n = 20 proveniente da un sito) sono stati preparati secondo le istruzioni accluse alla confezione dei reagenti Stem-Kit e analizzati con i citometri a flusso COULTER EPICS XL/XL-MCL. Sono stati eseguiti il gating e l'analisi automatici e manuali per ottenere i valori CD45+, CD34+ e CD34%.

Accuratezza dei metodi (Figure)

Campioni di sangue intero periferico fresco (n = 59)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Campioni di aferesi freschi (n = 51)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Campioni di sangue del cordone ombelicale congelati (n = 29)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Campioni di midollo osseo fresco (n = 33)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Campioni di aferesi congelati (n = 23)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Campioni di sangue del cordone ombelicale congelati (n = 31)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Campioni di midollo osseo congelati (n = 20)

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Precisione

Precisione inter-laboratorio

Sono stati eseguiti studi in una struttura clinica da parte di tre operatori, ciascuno con un citometro a flusso diverso. Sono stati individuati tre campioni che rappresentano l'intervallo dinamico CD34+ (0–2.000 cellule/ μ L):

Intervallo basso:	sangue periferico fresco, mobilizzato
Intervallo intermedio:	prodotto di aferesi
Intervallo alto:	prodotto di aferesi

Questi campioni vengono suddivisi in tre aliquote, un'aliquota di ciascun livello (basso, medio, alto) è stata fornita a ciascuno dei tre operatori. I campioni sono stati preparati (n = 10) a partire da ciascuna aliquota in base alle istruzioni accluse alla confezione dei reagenti Stem-Kit. Ciascun operatore ha effettuato l'analisi con un citometro a flusso EPICS XL utilizzando il gating e l'analisi automatici e manuali per ottenere i valori CD45+, CD34+ e CD34%. I valori sono espressi in termini di percentuali (%) della conta totale dei leucociti e come conte assolute (cellule/ μ L).

I risultati dello studio di precisione inter-laboratorio, per livello, sono illustrati nelle tabelle seguenti. I valori ottenuti per le conte assolute di CD45+ e CD34+ e per le percentuali di CD34 hanno mostrato una lieve variazione come evidenziato da medie, deviazioni standard e coefficienti di variazione per le misurazioni ripetute.

Per il grafico, consultare l'Appendice.

Precisione intra-laboratorio

I campioni che coprono l'intervallo dinamico del dosaggio sono stati ottenuti utilizzando sangue intero periferico fresco, midollo osseo fresco e aferesi e sangue del cordone ombelicale freschi e congelati provenienti da quattro siti di valutazione esterni. Dieci campioni di ciascuna tipologia sono stati preparati secondo le istruzioni accluse alla confezione dei reagenti Stem-Kit e analizzati con i citometri a flusso COULTER EPICS XL/XL-MCL utilizzando il gating e l'analisi manuali per ottenere i valori CD45+, CD34+ e CD34%.

I valori di CD45+, CD34+ e CD34% forniti nelle tabelle seguenti dimostrano che il metodo di analisi è riproducibile come si evince da medie, deviazioni standard e coefficienti di variazione di queste misurazioni. Le tabelle di dati riportate nell'APPENDICE dimostrano la precisione intra-laboratorio del dosaggio.

Per il grafico, consultare l'Appendice.

LIMITAZIONI

Per le limitazioni che si applicano quando si utilizza il metodo automatico, fare riferimento alla stemCXP System Guide (Guida al sistema stemCXP) in dotazione al software di sistema stemCXP.

- I campioni colorati e lisati devono essere conservati su ghiaccio e analizzati sul citometro a flusso secondo le informazioni fornite nella sezione “Stabilità del campione elaborato”, altrimenti potrebbero verificarsi risultati errati.
- Non diluire, aliquotare o congelare i reagenti. Utilizzare solo nelle condizioni in cui il prodotto è stato fornito.
- I reagenti vanno utilizzati solo con la citometria a flusso.
- Scongelare correttamente i campioni congelati per garantire una colorazione ottimale.
- Gli eritrociti potrebbero non subire la lisi nelle seguenti condizioni: presenza di eritrociti nucleati, concentrazioni proteiche anomale o emoglobinopatie. Queste condizioni possono causare una riduzione errata dei risultati CD34%, dovuta alla conta degli eritrociti non lisati inclusi nella conta degli leucociti. Le conte assolute di CD34+ e CD45+ non dovrebbero essere interessate.
- Alcuni pazienti potrebbero presentare problemi speciali dovuti a valori alterati o molto bassi di certe popolazioni cellulari.
- I risultati ottenuti con la citometria a flusso potrebbero essere errati se i gate sono impostati in modo improprio.
- I reagenti Stem-Kit sono pensati per l'uso con il colorante di vitalità 7-AAD per stabilire le cellule vitali HPC. Se il laboratorio utilizza un metodo di determinazione della vitalità alternativo, attenersi alle buone pratiche di laboratorio generali e alle procedure di controllo qualità del laboratorio per assicurare la qualità dei risultati ottenuti.

MARCHI COMMERCIALI

Beckman Coulter, il logo stilizzato ed i marchi commerciali dei prodotti e servizi di Beckman Coulter menzionati qui, sono marchi commerciali o marchi commerciali registrati di Beckman Coulter, Inc., negli Stati Uniti e in altri paesi.

INFORMAZIONI AGGIUNTIVE

www.beckmancoulter.com

Legenda dei simboli

Il Glossario dei simboli è disponibile all'indirizzo beckman.com/techdocs (documento numero B60062)

Reactivos Stem-Kit

REF IM3630 50 análisis

Para uso diagnóstico *in vitro*

USO PREVISTO

Los reactivos Stem-Kit se componen de un reactivo de anticuerpos monoclonales murinos fluorescentes de dos colores (FITC, PE), un control isoclónico fluorescente murino de dos colores (FITC, PE), un reactivo de recuento absoluto, un reactivo de viabilidad celular y un reactivo de lisado. Está previsto "Para uso diagnóstico *in vitro*" para la enumeración y la identificación simultáneas de recuentos absolutos y porcentajes de población de células CD45+ y CD45+ CD34+ dobles positivas en muestras biológicas mediante citometría de flujo. Las muestras biológicas pueden ser: sangre entera periférica movilizada o normal recién extraída, productos de aféresis recién extraídos o descongelados, sangre del cordón umbilical y médula ósea. Las mediciones de población celular se pueden llevar a cabo mediante un método de selección y análisis automatizado o manual.

Consulte el folleto de los reactivos Stem-Kit para obtener instrucciones completas si utiliza el método manual. Para obtener instrucciones completas si usa el método automatizado, consulte la stemCXP System Guide (Guía del sistema stemCXP) suministrada con el kit del software stemCXP 2.0 y stemCXP versión 2.0, WIN 7.

RESUMEN

Células progenitoras hematopoyéticas (HPC)

Los reactivos Stem-Kit se han diseñado para identificar células hematopoyéticas progenitoras (HPC) humanas con los siguientes criterios: "Las células CD34+ reales: (a) expresan el antígeno CD34, (b) expresan el antígeno CD45 con una intensidad de tinción característica de los blastocitos (es decir, se pueden detectar fácilmente pero a niveles inferiores que los linfocitos y monocitos) y (c) muestran dispersión de luz de ángulo lateral baja y dispersión de luz de ángulo frontal de baja a intermedia características de los blastocitos" (1). La exclusión de células CD34+ HPC muertas de la enumeración de células CD34+ HPC viables se consigue usando el marcador de viabilidad 7-AAD (2).

CD34

El antígeno CD34 es una familia de glucoproteínas transmembranarias de una sola cadena del tipo I glucosiladas de forma diferencial (3, 4, 5). Se expresa en prácticamente todas las células progenitoras hematopoyéticas, incluidas las células madre multipotentes. Los epítomos CD34 se han dividido en tres clases según la sensibilidad a la neuraminidasa y a la glucoproteasa de *Pasteurella hemolítica* (6). El anticuerpo monoclonal (mAb) CD34 utilizado en los reactivos Stem-Kit se denomina 581. Reconoce de forma específica un epítipo de clase III de la molécula CD34 (7), tal como definen los patrones de segmentación enzimática (6, 8). El anticuerpo monoclonal 581 se asignó a CD34 durante el 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5.º Taller HLDA sobre antígenos de diferenciación de los leucocitos humanos) que tuvo lugar en Boston (Massachusetts, EE. UU.) en 1993 (7).

CD45

El anticuerpo CD45 reconoce miembros de la familia CD45 de antígenos panleucocitarios con un peso molecular de 180, 190, 210 y 220 kD (9, 10, 11). También se conoce como el antígeno común leucocitario (LCA). El antígeno CD45 se expresa en todos los tipos de células hematopoyéticas excepto en glóbulos rojos maduros y en sus células progenitoras inmediatas (11, 12). No se ha detectado en tejido no hematopoyético diferenciado (12, 13, 14, 15). El mAb CD45 empleado en los reactivos Stem-Kit se denomina J33. Se asignó a CD45 durante el 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3.er Taller HLDA sobre antígenos de diferenciación de los leucocitos humanos) celebrado en Oxford (Inglaterra) en 1986 (16).

7-AAD

El marcador de viabilidad 7-aminoactinomicina D (7-AAD) es un producto análogo de la actinomicina D que contiene un grupo amino sustituido en la posición 7 del cromóforo. El marcador de viabilidad 7-AAD se intercala entre las bases citosina y guanina del ADN (15). Las actinomicinas son compuestos biológicamente activos que contienen un cromóforo 2-amino-4, 6 dimetilfenoxazona-3 y dos pentapéptidos cíclicos (17). Las actinomicinas forman complejos estables con el ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, pero nunca con el ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena ni con híbridos de ADN y ARN ni ADN o ARN de cadena simple (15, 18).

Las propiedades espectrales del marcador de viabilidad 7-AAD permiten que esta molécula sea adecuada particularmente para el análisis de citometría de flujo (17). La máxima absorción del complejo 7-AAD/ADN se sitúa en la región espectral verde y, por tanto, es adecuado para un citómetro equipado con láser de argón (longitud de onda de excitación de 488 nm) (15). La emisión de fluorescencia roja intensa del marcador de viabilidad 7-AAD (de 635 a 675 nm) permite que esta sonda sea más fácil de utilizar junto con los anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) porque, en contraposición al yoduro de propidio (PI), el complejo 7-AAD/ADN muestra una superposición espectral mínima con FITC y PE (17).

Las células necróticas, apoptóticas o dañadas son fuentes de interferencia en el análisis de las células viables mediante citometría de flujo. Las células no viables se deben evaluar y distinguir a partir de la tinción de 7-AAD positivo; las células no viables quedarán sin teñir (negativas) (19).

Sistemas de citómetro de flujo

Los sistemas de citómetro de flujo (FC 500) aplican los principios de la citometría de flujo para analizar muestras biológicas a fin de identificar diversas poblaciones de células determinadas por los anticuerpos monoclonales específicos y los fluorocromos utilizados. En esta prueba se utilizan los sistemas de citómetro de flujo FC 500 equipados con el software del sistema CXP para analizar las muestras.

PRINCIPIO

Esta prueba depende de la capacidad del anticuerpo monoclonal para unirse a la superficie de las células que expresan determinantes antigénicos discontinuos. El reactivo CD45-FITC / CD34-PE de los reactivos Stem-Kit es una combinación de dos anticuerpos monoclonales murinos, cada uno conjugado con un fluorocromo concreto y específico para un antígeno de superficie celular diferente. La tinción de la superficie celular específica se consigue mediante la incubación de dos muestras duplicadas de una muestra biológica con el reactivo de dos colores CD45-FITC / CD34-PE.

En una prueba adicional, la misma muestra se tiñe con el reactivo CD45-FITC / IsoClonic Control-PE para comprobar la unión no específica del anticuerpo monoclonal CD34-PE. El marcador de viabilidad 7-AAD, un colorante ácido nucleico que se une a los pares de bases accesibles (ADN celular), se utiliza para distinguir entre las células viables y las no viables. Los eritrocitos de cada muestra se lisan con la solución de lisado NH₄Cl preparada en 1X. Se añaden las Stem-Count Fluorospheres o Flow-Count Fluorospheres (el reactivo de recuento absoluto) y las células restantes se analizan mediante citometría de flujo. El control de calidad y el control del proceso, para el ensayo, se proporcionan con los reactivos de control de calidad de la muestra y el instrumento: Flow-Check Fluorospheres, Flow-Set Fluorospheres, reactivos de compensación apropiados y Stem-Trol Control Cells.

EJEMPLOS DE APLICACIONES CLÍNICAS

Una cronología de informes científicos de células hematopoyéticas progenitoras (HPC) muestra que los primeros estudios se basaban en recuentos de células nucleadas para la cuantificación. Los estudios posteriores que comprenden ensayos de unidades formadoras de colonias (CFU) proporcionaron aproximaciones imprecisas de poblaciones de células progenitoras. Tras los ensayos de CFU que requerían mucho tiempo, se descubrió la molécula de superficie celular CD34. Se observó que la molécula CD34 estaba presente en la superficie de las células hematopoyéticas tempranas y las células hematopoyéticas formadoras de colonias en la médula ósea y sangre periférica (20). A continuación, se desarrollaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra la molécula CD34 y se utilizaron en citometría de flujo. Las determinaciones de CD34 mediante citometría de flujo tienen una amplia aceptación hoy en día como medio para evaluar las células madre y hematopoyéticas progenitoras.

En la médula ósea de personas normales, entre el 1 % y el 3 % de las células que expresan el antígeno CD34 poseen la capacidad de reconstituir la hematopoyesis de diferentes estirpes celulares a largo plazo (3, 20). En la sangre periférica de personas normales, menos del 0,1 % de las células circulantes expresan el antígeno CD34 (1, 21). El uso de reactivos Stem-Kit proporciona un método de citometría de flujo rápido, simple y sensible para enumerar las células madre y progenitoras hematopoyéticas en la sangre periférica, productos de leucocitaféresis, médula ósea y sangre del cordón umbilical.

CONTENIDO DEL REACTIVO

Los reactivos Stem-Kit contienen:

- Reactivo CD45-FITC / CD34-PE (45/34), 1 vial.
- Reactivo CD45-FITC / IsoClonic Control-PE (45/CTRL), 1 vial.
- Fluoroesferas Stem-Count, 1 vial.
- Marcador de viabilidad 7-AAD, 1 vial.
- Solución de lisado de NH₄Cl 10X, 2 viales.

1. Estos reactivos deben utilizarse de manera conjunta, tal como se suministran en el kit.

Se pueden emplear las fluoroesferas Flow-Count, que son equivalentes a las fluoroesferas Stem-Count, para determinar el recuento absoluto si se aplica la concentración preparada específica.

2. El CD45-FITC / CD34-PE es un reactivo de dos colores listo para usar suministrado en 2,2 mL de solución salina tamponada de fosfato (PBS) que contiene 2 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA) y azida sódica al 0,1 % como conservante.
3. El CD45-FITC / IsoClonic Control-PE es un reactivo de dos colores listo para usar suministrado en 1,2 mL de PBS que contiene 2 mg/mL de BSA y azida sódica al 0,1 % como conservante. El reactivo CD45-FITC / IsoClonic Control-PE es una mezcla de anticuerpos monoclonales 581 sin conjugar y conjugados con PE (idénticos a CD34). Esta mezcla sirve como control isomorfológico apropiado para verificar la unión no específica del mAb CD34-PE en cada una de las muestras.

NOTA: Los reactivos CD45-FITC / CD34-PE y CD45-FITC / IsoClonic Control-PE no deben separarse. Al llevar a cabo las pruebas y los controles, debe prestarse especial atención para que ambos reactivos posean el mismo número de lote en la etiqueta del vial.

Resumen de características de anticuerpos

Especificidad	CD45	CD34
Clon	J33	581
Hibridoma	NS1 x balb/c	NSO x Balb/c
Inmunógeno	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Cadena Ig	Cadenas ligeras de IgG1, κ	Cadenas ligeras de IgG1, κ
Especie	Ratón	Ratón
conjugaci	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	R ficoeritrina (PE)
Proporción molar	5-8 mol FITC/mol Ig	0,5-1,5 mol PE/mol Ig
Longitud de onda de excitación	488 nM (azul-verde)	488 nM (azul-verde)
Emisión de fluorescencia	de 504 a 541 nm (principalmente naranja)	de 568 a 590 nm (principalmente naranja)

- Las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count se componen de microesferas fluorescentes de poliestireno de 10 μm (diámetro nominal) suspendidas en 20 mL de medio acuoso con surfactante y un 1 % de formaldehído. Cada fluoroesfera contiene un tinte con un rango de emisión de fluorescencia de 525 nm a 700 nm cuando la excitación se produce a 488 nm. La concentración preparada de fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count (fluoroesferas/ μL) se ha obtenido a partir de varios análisis duplicados efectuados con un analizador de tamaño de partículas COULTER. El número de lote específico se indica en la etiqueta del vial.
- El marcador de viabilidad 7-AAD se proporciona en una solución salina tamponada de fosfato (PBS: 0,01 M de fosfato de sodio, 0,145 M de cloruro de sodio, pH 7,2) al 99 %, con un 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO).
- La solución de lisado de NH_4Cl es una solución de 20 mL 10X concentrada. Contiene una mezcla de cloruro amónico (NH_4Cl), bicarbonato de potasio (KHCO_2) y ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Las preparaciones de anticuerpos monoclonales contienen azida sódica al 0,1 %. La azida sódica en condiciones ácidas produce ácido hidrazoico, un compuesto extremadamente tóxico. La eliminación mediante sistemas de alcantarillado se debe acompañar con grandes cantidades de agua corriente para evitar la acumulación peligrosa en las tuberías metálicas y posibles explosiones.
- Toda muestra o toma, así como todo elemento material que estuviese en contacto con él, debe considerarse como potencialmente infecciosa y manipularse con las precauciones de uso.
- Nunca pipetee con la boca y evite el contacto de las muestras o reactivos con la piel y las mucosas.
- No use los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.
- Las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count contienen un 1 % de formaldehído. Evite el contacto con la piel y los ojos, ya que el formaldehído puede provocar efectos irreversibles en estos tejidos. No respirar los vapores. Lleve puesto el equipo de seguridad apropiado, por ejemplo, guantes y gafas.
- No someta los reactivos Stem-Kit a una fuente de luz intensa ni a altas temperaturas durante su almacenamiento o su uso.
- Evite la evaporación y la pérdida de fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count; de lo contrario, pueden producirse resultados erróneos. Cierre bien los viales después de usarlos y almacénelos en posición vertical.
- Asegúrese de que las fluoroesferas están resuspendidas por completo antes de utilizarlas. Evite mezclar en exceso a fin de reducir al máximo la formación de burbujas de aire. No pipetee burbujas de aire, ya que pueden generarse resultados erróneos.
- Utilice una pipeta calibrada (a ser posible, una pipeta de desplazamiento positivo o de repetición) para dispensar las muestras y las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count; de lo contrario, es posible obtener resultados erróneos.
- Utilice las técnicas de pipeteo que recomienda el fabricante de la pipeta a fin de garantizar un pipeteo exacto y preciso de la muestra y de las fluoroesferas Stem-Count y Flow-Count; de lo contrario, pueden generarse resultados erróneos.
- Las muestras teñidas y lisadas deben almacenarse en hielo y analizarse en el citómetro de flujo de acuerdo con la información de la sección «Estabilidad de la muestra procesada»; de lo contrario, los resultados podrían ser erróneos.
- Asegúrese de que se realiza el recuento de 1000 fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count, o de que no se produzca la conversión automática de los resultados a recuentos absolutos.
- Cada lote de fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count posee una concentración específica de fluoroesferas. Asegúrese de que se utiliza la concentración preparada correcta a la hora de determinar los resultados de recuento absoluto.
- No deben utilizarse métodos de preparación de requieran un paso de lavado dada una pérdida de células no esclarecida.

15. El uso de tiempos de incubación o de mezcla, o de temperaturas diferentes a los especificados puede dar lugar a resultados erróneos.
16. El marcador de viabilidad 7-AAD contiene un 0,005 % de 7-AAD. El 7-AAD puro puede causar cáncer. Aunque este compuesto se diluye en gran medida, recomendamos que se evite el contacto con la piel y los ojos, y el uso de ropa y guantes de protección adecuados, así como protección facial/ocular.
17. El marcador de viabilidad 7-AAD contiene un 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO puro es irritante. Aunque este compuesto se diluye, recomendamos que se evite el contacto con la piel y los ojos, y el uso de ropa y guantes de protección adecuados, así como protección facial/ocular.
18. Al tratarse de un cromóforo, el 7-AAD es sensible a la luz. Guarde el marcador de viabilidad 7-AAD en el recipiente del paquete de cartón del kit para evitar que esté constantemente en contacto con la luz durante su almacenamiento.
19. Las muestras mezcladas deben exponerse lo mínimo posible a la luz durante la incubación.
20. Siga las prácticas de laboratorio recomendadas al manipular los reactivos.

CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

Fluoroesferas Stem-Count

PELIGRO



H316

Provoca irritación cutánea leve.

H317

Puede provocar una reacción cutánea alérgica.

H350

Puede causar cáncer.

P201

Procurarse las instrucciones antes del uso.

P280

Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.

P308+P313

EN CASO DE exposición confirmada o supuesta: consultar a un médico.

P333+P313

En caso de irritación cutánea o sarpullido: consulte a un médico.

P362+P364

Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de usarla.

Formaldehído 0,5 - 1,0 %
masa de reacción de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1) < 0,05 %

Colorante 7-AAD - Viabilidad celular

ATENCIÓN

H316

Provoca irritación cutánea leve.

P332+P313

En caso de irritación cutánea: consultar a un médico.

Dimetilsulfóxido 0,5 - 2 %



La hoja de datos de seguridad está disponible en beckman.com/techdocs

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El reactivo sin abrir es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el vial cuando se guarda a una temperatura de 2-8 °C sin luz. No lo utilice después de la fecha de caducidad. No lo congele. Los reactivos Stem-Kit son estables durante 30 días tras la apertura del vial de fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count. Los viales abiertos se deben volver a cerrar inmediatamente tras su uso y guardarse a una temperatura de 2-8 °C sin luz. NO se deben alicuotar las fluoroesferas Stem-Count ni Flow-Count de su vial original.

IMPORTANTE: Pueden generarse resultados erróneos si se producen fugas de fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count. Una vez abiertas, las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count, deben almacenarse en posición vertical para impedir cualquier posible fuga. No se deben utilizar los reactivos si se observan indicios de fuga.

Signos de Deterioro

Las siguientes situaciones pueden dar lugar al deterioro:

Reactivos Stem-Kit, excepto fluoroesferas Stem-Count

- Alteración del aspecto normal tal como se indica a continuación.

Reactivo	Aspecto normal
CD45-FITC / CD34-PE	Líquido transparente, ligeramente rosa
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Líquido de transparente a ligeramente rosa
Colorante 7-AAD - Viabilidad celular	Líquido transparente, de ligeramente rosa a rojizo
Solución de lisado NH_4Cl	Líquido transparente e incoloro

Stem-Count Fluorospheres

- Aspecto, durante la adquisición, de las poblaciones fluorescentes secundarias con más de un 20 % de la población total de fluoroesferas.
- Existe una variación importante en los valores obtenidos para los recuentos o muestras.

IMPORTANTE: No utilice los reactivos si presentan indicios de deterioro; de lo contrario, se pueden obtener resultados incorrectos. Contacte con un representante local de Beckman Coulter si detecta indicios de deterioro.

Preparación de los Reactivos

- Los reactivos de dos colores CD45-FITC / CD34-PE y CD45-FITC / IsoClonic Control-PE se usan directamente del vial sin necesidad de diluirlos.
- Las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count se utilizan directamente del vial, sin ningún tipo de dilución. Debe extraerse todo el aluminio que se encuentra en el sello de calor de la parte superior del frasco al abrirlo por primera vez. Es necesario mezclar debidamente. Al manipular por primera vez en la jornada el vial de fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count, mezcle en el vórtex durante 3-5 segundos.

Antes de pipetear desde el vial, dé la vuelta al vial 3-5 veces para agitarlo bien.

Tras la mezcla en vórtex inicial al comenzar la jornada, el vial de fluoroesferas debe volver a conservarse a una temperatura de 2-8 °C hasta que se utilice.

Para evitar que el contenido del vial se evapore o se produzcan fugas, tápelo bien después de usarlo.

- El marcador de viabilidad 7-AAD se usa directamente del vial sin diluir.
- Debe prepararse una solución de lisado de NH_4Cl 1X a diario: agregue nueve volúmenes de agua desionizada a un volumen de solución de lisado concentrada de NH_4Cl 10X. No refrigere. Al concluir la jornada, deseche la solución de lisado de NH_4Cl 1X que no haya utilizado.

Exponga todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de su utilización.

MANEJO DE MUESTRAS

Requisitos de muestras

Resumen de manipulación de muestras:

Tipo de espécimen	Método de selección	Temperatura de almacenamiento	Antigüedad de la muestra
Aféresis	Algoritmo	2-8 °C	24 horas
	Manual	2-8 °C	24 horas
Médula ósea	Algoritmo	2-8 °C	24 horas
	Manual	2-8 °C	24 horas
Sangre del cordón umbilical	Algoritmo	18-25 °C	24 horas
	Manual	18-25 °C	24 horas
Sangre total normal	Algoritmo	18-25 °C	20 horas
	Manual	18-25 °C	20 horas
Sangre total movilizada	Algoritmo	18-25 °C	20 horas
	Manual	18-25 °C	20 horas

- Las muestras biológicas pueden ser: sangre entera periférica movilizada o normal recién extraída, productos de aféresis recién extraídos o descongelados, sangre del cordón umbilical y médula ósea.

2. Las células hematopoyéticas progenitoras (HPC) manipuladas o purificadas solo se pueden analizar con el método de selección manual.
3. Obtenga productos de aféresis, especímenes de sangre periférica, especímenes de sangre del cordón umbilical o especímenes de médula ósea de manera aséptica en un tubo para extracción de sangre al vacío estéril con anticoagulante ACD fórmula A o EDTA K3.
4. Los especímenes de sangre total y de sangre total movilizada recogidos en tubos con anticoagulante se pueden almacenar durante un máximo de 20 horas a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de la tinción.
5. Los especímenes de sangre de cordón umbilical recogidos en tubos con anticoagulante se pueden almacenar durante un máximo de 24 horas a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de la tinción.
6. Los productos de aféresis y las muestras de médula ósea se pueden almacenar hasta 24 horas a 2-8 °C antes de la tinción.
7. Antes de preparar la muestra, asegúrese de que la concentración de leucocitos (WBC) no sea superior a 30×10^9 leucocitos/L. Si es necesario, diluya la muestra con HBSS o equivalente para alcanzar un valor medio de 15×10^9 leucocitos/L. Anote el factor de dilución para el cálculo del recuento absoluto de HPC final.
8. Las concentraciones bajas de proteínas pueden provocar la aglomeración de las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count y arrojar recuentos celulares absolutos erróneamente elevados. La dilución de muestras con una concentración de proteínas baja debe realizarse con un tampón enriquecido con proteínas.
9. Todas las muestras se deben procesar con los reactivos Stem-Kit y el marcador de viabilidad 7-AAD.

Procedimiento de Tratamiento de los Especímenes

Realice las pruebas por duplicado, en conformidad con las "The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry" (Directrices ISHAGE relativas a la determinación de las células CD34+ por citometría de flujo), (1).

NOTA: Para el procesamiento de las células de control Stem-Trol, consulte el folleto de las células de control Stem-Trol para obtener instrucciones completas si usa el método manual. Para obtener instrucciones completas si usa el método de análisis automatizado, consulte la stemONE System Guide (Guía del sistema stemONE) proporcionada con el software del sistema stemONE o la stemCXP System Guide (Guía del sistema stemCXP) proporcionada con el software del sistema stemCXP.

1. Para cada muestra, etiquete tres tubos de muestra de la siguiente forma:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipetee 20 µL de reactivo CD45-FITC / CD34-PE en los tubos de muestra: 45/34/7-AAD #1 y 45/34/7-AAD #2.
3. Pipetee 20 µL del reactivo CD45-FITC / IsoClonic Control-PE en el tubo de muestra: 45/CTRL/7-AAD.
4. Pipetee 20 µL de marcador de viabilidad 7-AAD en todos los tubos de muestra.

IMPORTANTE: Existe un riesgo de lisis incompleta si la muestra sanguínea permanece en la parte superior o lateral del tubo de muestra. Realice el pipeteado con cuidado para prevenir que la sangre entre en contacto con la parte superior o lateral del tubo de muestra. Si fuera necesario, limpie el tubo de muestra con ayuda de bastoncillo de algodón para eliminar todo rastro de muestra sanguínea de la parte superior o lateral tubo de muestra.

5. Con una pipeta de desplazamiento positivo o una pipeta de repetición, pipetee 100 µL de la muestra del paciente en el tubo de muestra.
6. Mezclar inmediatamente el tubo en el Vórtex durante 5 segundos.
7. Incube todos los tubos de muestra a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 20 minutos y protegidos de la luz.
8. Tras la incubación, añada 2 mL de solución de lisado NH₄Cl 1X preparada a cada tubo de muestra y mezcle en vórtex inmediatamente durante 5 segundos.

NOTA: Para obtener información sobre la preparación de la solución de lisado, consulte la sección 7.2 anterior (PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS).

IMPORTANTE: Existe riesgo de resultados erróneos si se pipetea burbujas de aire. La mezcla en exceso de las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count puede provocar la formación de burbujas de aire. Evite mezclar en exceso las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count y no pipetee burbujas de aire dentro de los tubos de muestra.

9. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos, protegido de la luz.

10. Mezcle suavemente las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count dando la vuelta al vial de 3 a 5 veces antes de su utilización.
11. Antes de la adquisición, e inmediatamente después del paso 9, pipetee 100 µL de fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count en cada uno de los tres tubos de muestra con una pipeta de repetición o de desplazamiento positivo.
12. Mezcle inmediatamente en el vórtex cada tubo de muestra durante 5 segundos.

NOTA: Para obtener información sobre la preparación de la solución de lisado, consulte la sección 7.2 anterior (PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS).

Resumen de tinción de muestras

Reactivos y muestras	45/34/7-AAD #1	Etiqueta del tubo de muestra 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
Colorante 7-AAD - Viabilidad celular	20 µL	20 µL	20 µL
Muestra	100 µL	100 µL	100 µL
Vórtex – Incube a temperatura ambiente durante 20 minutos. Protéjase de la luz.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vórtex – Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos. Protéjase de la luz.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Agite			
En el caso de productos de aféresis, muestras de sangre de cordón umbilical y muestras de médula ósea, no deje las muestras más de 60 minutos en hielo antes de la adquisición.			
En el caso de muestras de sangre total y muestras de sangre total movilizada, no deje las muestras más de 45 minutos en hielo antes de la adquisición.			
Analice las muestras descongeladas de inmediato.			
Proteger de la luz			

Estabilidad de la muestra procesada:

- En el caso de productos de aféresis, muestras de sangre de cordón umbilical y muestras de médula ósea, después de la adición de las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count no deje las muestras más de 60 minutos en hielo antes de la adquisición.
- En el caso de muestras de sangre total y sangre total movilizada, después de la adición de las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count no deje las muestras más de 45 minutos en hielo antes de la adquisición.
- En el caso de muestras congeladas, la adquisición debe hacerse inmediatamente después de la adición de las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count.
- Las muestras procesadas deben almacenarse en hielo protegidas de la luz y limitar su exposición a temperatura ambiente tanto como sea posible durante la adquisición.

CONTENIDO

El conservante de azida sódica puede formar compuestos explosivos en las tuberías metálicas del desagüe. Véase el NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Boletín de NIOSH: Peligro de explosión con la azida) (16/8/76).

Para evitar la posible acumulación de compuestos de azida, limpie con agua los tubos de desagüe tras la eliminación del reactivo sin diluir. Para desechar la azida sódica deben seguirse las normativas locales adecuadas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS CON EL KIT:

1. Agua desionizada.
2. Solución salina equilibrada de Hank (HBSS) o equivalente
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)

8. Una alternativa a las Stem-Count Fluorospheres: las Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
9. Baño de agua helada
10. Tubos de muestra de plástico (12 × 75 mm)
11. Pipeta de repetición calibrada (20 µL, 100 µL, 2 mL) y puntas o pipetas de desplazamiento positivo calibradas (20 µL, 100 µL, 2 mL) y puntas.
12. Pipetas estándar graduadas (20 µL, 100 µL, 2 mL) y puntas.
13. Mezclador automático (tipo Vórtex).
14. Cronómetro.
15. Citómetro de flujo.
16. Kit del software stemCXP 2.0, versión 2.0 de stemCXP, WIN 7, SOLO para análisis automatizados de muestras en el sistema de citómetro de flujo FC 500 equipado con el software CXP (versión 2.0).

RESULTADOS

Configuración del protocolo de análisis

El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar dispersión frontal, dispersión lateral y cuatro canales de fluorescencia. Para el canal FL3 (para la detección de las Stem-Count o Flow-Count Fluorospheres) utilice un filtro band pass 620 nm. Para el canal FL4 (para la detección del marcador de viabilidad 7-AAD) utilice un filtro long pass 675 nm.

Asegúrese de que el citómetro de flujo esté bien alineado y calibrado para medir la intensidad de fluorescencia.

Comprobar que el citómetro de flujo esté correctamente ajustado para las compensaciones de fluorescencia.

NOTA: En el análisis de muestras, las posiciones de todas las regiones son aproximadas hasta que finaliza la adquisición del tubo de muestra 45/34/7-AAD #1. Las regiones se optimizan en función del protocolo siguiente y, por lo tanto, NO se ajustan para el segundo y el tercer tubo de muestra del panel.

Para analizar la muestra, es necesario aplicar el método de selección y realizar una serie de 8 histogramas (consulte a continuación). Cuando se utilicen las células de control CD34+, es necesario aplicar el mismo método de selección y realizar la misma serie de 8 histogramas. Las regiones A, B, C y D (para conocer la definición de una región, consulte la sección “Creación de las regiones”) se deben adaptar para incluir las características de agrupamiento de las células de control CD34+.

Creación de los Histogramas:

Cree histogramas del modo siguiente:

1. Cree un Histograma 1 con FL1 CD45-FITC frente a dispersión lateral.
2. Cree un Histograma 2 con FL2 CD34-PE frente a dispersión lateral.
3. Cree un Histograma 3 con FL1 CD45-FITC frente a dispersión lateral.
4. Cree un Histograma 4 con dispersión frontal frente a dispersión lateral.
5. Cree un Histograma 5 con FL1 CD45-FITC frente a FL2 CD34-PE.
6. Cree un Histograma 6 con dispersión frontal frente a dispersión lateral.
7. Cree un Histograma 7 correspondiente a Tiempo frente a fluoroesferas FL3 Stem-Count o Flow-Count.
8. Cree un Histograma 8 con el marcador de viabilidad FL4 7-AAD frente a dispersión lateral.

Los histogramas del 1 al 4 tienen como objetivo caracterizar las células CD34+ HPC, un proceso que puede retrasarse hasta la fase de análisis. Estos cuatro primeros histogramas están definidos de acuerdo con las “The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry” (Directrices ISHAGE relativas a la determinación de las células CD34+ por citometría de flujo), (1, 2). Los histogramas del 5 al 7 tienen como objetivo monitorizar parámetros que son importantes durante la fase de adquisición. Esto incluye el discriminador de la dispersión frontal, el número de eventos CD45+ que debe recogerse y la acumulación correcta de singletes de fluoroesfera.

El Histograma 8 tiene como objetivo distinguir los eventos viables de los no viables y analizarlos.

Creación de las Regiones

Crear regiones del modo siguiente:

1. Histograma 1 – Cree una región A rectilínea en el Histograma 1 para que incluya todos los leucocitos CD45+ y excluya las plaquetas, residuos de glóbulos rojos y agregados.

2. Histograma 1 – Cree la región E amorfa en el Histograma 1 para incluir los linfocitos (CD45 brillantes, baja dispersión lateral).
3. Histograma 2 – Cree la región B rectilínea en el Histograma 2 con el fin de incluir todos los eventos CD34+. Detenga el recuento en los 75 000 eventos (eventos CD45+) para el Histograma 2.
4. Histograma 3 – Cree la región C amorfa en el Histograma 3 con el fin de incluir todos los eventos CD45dim agrupados.
5. Histograma 4 – Cree la Región D amorfa en el Histograma 4 para incluir todos los eventos agrupados con dispersión lateral (side scatter) intermedia y dispersión frontal (forward scatter) de intermedia a alta.
6. Histograma 5 – Cree la Región I Quadstat en el Histograma 5 para verificar el límite inferior de la expresión de CD45 en los eventos CD34+.
7. Histograma 5 – Cree la región H amorfa en el Histograma 5 que englobe todas las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count, incluidos los dobletes. La región H debe situarse en el ángulo superior derecho del Histograma 5.

NOTA: Asegúrese de que la Región H esté diseñada como una región AMORPHOUS (AMORFA).

8. Histograma 5 – Cree la región K rectilínea (denominada “listgate –”) en el Histograma 5. Establezca los contornos de la región K en la primera década logarítmica del histograma biparamétrico. La región K permite eliminar los eventos dobles negativos durante la adquisición con el fin de analizar 75 000 eventos CD45+ de interés.
9. Histograma 6 – Copiar la Región D del Histograma 4 como Región F en el Histograma 6.
10. Histograma 7 – Cree la región G rectilínea en el Histograma 7 que incluya solo los singletes de las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count. La región G puede etiquetarse como “CAL” para permitir el cálculo automático del número absoluto de CD34+ HPC (para obtener información complementaria, consulte el manual del instrumento).
11. Histograma 8 – Cree una región J rectilínea en el Histograma 8 para incluir los leucocitos viables (eventos negativos del marcador de viabilidad 7-AAD).

Creación de las Ventanas de Análisis

Crear selecciones de poblaciones del modo siguiente:

1. Histograma 1 – Asigne “J” al Histograma 1 con el fin de visualizar todos los eventos viables. Si no se utiliza 7-AAD, asigne la región “-H” al Histograma 1 para visualizar todos los eventos excepto con exclusión de todas las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count que incluyan dobletes.
2. Histograma 2 – Asigne “AJ” (“A” si no se usa 7-AAD) al Histograma 2 para visualizar todos los eventos CD34+ viables (totales si no se usa 7-AAD).
3. Histograma 3 – Asigne “A”, “B” y “J” (“A” y “B” si no se usa 7-AAD) al Histograma 3 para visualizar todos los eventos CD45+ / CD34+ viables (totales si no se usa 7-AAD).
4. Histograma 4 – Asigne “A”, “B”, “C” y “J” (“A”, “B” y “C” si no se usa 7-AAD) al Histograma 4 con el fin de visualizar todos los eventos agrupados CD45+/CD34+ viables (totales si no se usa 7-AAD) con dispersión lateral baja mientras se excluyen las plaquetas y los residuos. Los eventos procedentes de la región ABCDJ corresponden a las células CD34+ HPC viables.
5. Histograma 5 – Sin ventanas de análisis, para mostrar todos los eventos.
6. Histograma 6 – Asigne “EJ” (“E” si no se usa 7-AAD) al Histograma 6 para visualizar los linfocitos viables (totales si no se usa 7-AAD) como un control visual en el discriminador.
7. Histograma 7 – Asigne “H” al Histograma 7 con el fin de visualizar todas las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count que incluyan dobletes.
8. Histograma 8 – Asigne la región “A” al Histograma 8 con el fin de visualizar todos los eventos CD45+.

Ajuste de la citometría de flujo

1. Verifique que el citómetro de flujo está correctamente alineado y optimizado para las intensidades de fluorescencia y dispersión de luz de los detectores FL1, FL2, FL3 y FL4 según las directrices del laboratorio y del fabricante. Compruebe que la compensación de color esté configurada para una operación estándar. Para obtener información complementaria, consulte el manual del instrumento.
2. Mezcle al Vórtex los tubos de muestra durante 5 segundos.
3. Realice la adquisición de datos en el citómetro de flujo. Debe analizarse un mínimo de 75 000 eventos CD45+.
4. Para el análisis de muestras: ajuste el discriminador y las regiones tras analizar el tubo de muestra 45/34/7-AAD #1. Guarde el protocolo y analice los tubos de muestra 45/34/7-AAD #2 y 45/CTRL/7-AAD sin efectuar ningún otro ajuste.

Ejemplo de Análisis

Los histogramas que se muestran en el ANEXO se entregan en un orden numérico ascendente, tal como se indica en el protocolo.

Cálculo de CD34+ HPC para la muestra

El número de CD34+ HPC se calcula como el promedio de los resultados estadísticos de la región D para las dos muestras duplicadas (es decir, 45/34/7-AAD #1 y 45/34/7-AAD #2).

Los resultados de CD34+ HPC se consideran válidos si los resultados que obtiene el reactivo CD45-FITC / IsoClonic Control-PE son inferiores al 10 % en comparación con los resultados de CD34+ HPC.

1. Calcule el promedio de los resultados obtenidos en los tubos de muestra 45/34/7-AAD #1 y 45/34/7-AAD #2 para cada muestra (es decir, el promedio de los resultados estadísticos impresos de la región D). El número de CD34+ HPC puede que sea equivalente a un 10 % de la media de las muestras duplicadas. El valor obtenido con el tubo de control 45/CTRL/7-AAD debe representar menos de un 10 % del valor promedio obtenido en los tubos de prueba para validar los resultados.

NOTAS:

Si la media del recuento absoluto obtenido para el duplicado CD34+ HPC se encuentra fuera del rango aceptado (por ejemplo, supera el 10 %), determine si el pipeteado se efectuó de manera correcta, particularmente para las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count. Compruebe visualmente los informes del citómetro de flujo y la calidad de los procesos de tinción y de lisado en los tubos de muestra. Verifique la forma en que se establecieron los contornos de la región.

Si el valor obtenido con 45/CTRL/7-AAD no se corresponde con el intervalo de valores aceptados (es decir, es superior en un 10 % a la media del recuento absoluto obtenida para el duplicado), compruebe si el pipeteo se ha efectuado correctamente, en especial en el caso de las fluoroesferas Stem-Count o Flow-Count. Compruebe visualmente los informes del citómetro de flujo y la calidad de los procesos de tinción y de lisado en los tubos de muestra. Verifique la forma en que se establecieron los contornos de la región.

Si es necesario, repita el paso de adquisición añadiendo un tubo BLANK tras el primer tubo duplicado 45/34/7-AAD #1 y #2 y antes del tubo 45/CTRL/7-AAD. Si es necesario, repita toda la preparación con tubos de muestra nuevos y añada el tubo BLANK. Efectúe la adquisición y analice tanto los tubos de muestra nuevos como los utilizados previamente. Compare los dos resultados. Si no concuerdan, contacte a un representante local de Beckman Coulter.

2. Si la muestra se ha diluido, el resultado anterior obtenido se DEBE multiplicar por el factor de dilución adecuado (Dil). El resultado final obtenido es el recuento absoluto de células CD34+ HPC (células/ μ L).

Recuento absoluto de CD34+ HPC (células/ μ L) = Resultado impreso del recuento absoluto de CD34+ HPC (células/ μ L) $\times$ Dil

3. Para los paquetes de aféresis, el número total de CD34+ HPC por paquete se puede calcular mediante la fórmula siguiente:

Número total de CD34+ HPC por paquete = Recuento absoluto de CD34+ HPC (células/ μ L) $\times 10^6 \times$ volumen del paquete (L)

Donde:

4. Para determinar el porcentaje de CD34+ HPC en el cálculo de leucocitos CD45+, consulte la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Recuento absoluto de CD34+ HPC (células/ μ L)} \quad \text{X 100}}{\text{Recuento absoluto de leucocitos CD45+ (células/ μ L)}} \\ \text{(es decir, resultados impresos de la región D)} \quad \text{(es decir, resultados impresos de la región A)}$$

CONTROL DE CALIDAD

Asegúrese de que el citómetro de flujo está correctamente alineado según las recomendaciones del fabricante incluidas en los manuales del instrumento. Las intensidades objetivo se han establecido para optimizar la configuración de la dispersión de la luz y la fluorescencia del instrumento para analizar muestras teñidas con el reactivo de anticuerpos monoclonales CD45-FITC / CD34-PE y el reactivo CD45-FITC / IsoClonic Control-PE.

Los fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y 7-aminoactinomicina D (7-AAD) emiten a longitudes de onda diferentes; sin embargo, presentan cierto grado de superposición espectral que debe corregirse mediante compensación electrónica. Los niveles óptimos de compensación pueden determinarse mediante el análisis, en un histograma biparamétrico, de una muestra de sangre total enriquecida con Stem-Trol Control Cells teñidas con el marcador de viabilidad 7-AAD y con los reactivos de compensación pertinentes si se utiliza el software CXP. En este análisis, se han

efectuado una serie de ajustes para garantizar que no se produzca la tinción en el cuadrante de doble color con cualquiera de los fluorocromos.

El marcador de viabilidad 7-AAD (7-aminoactinomicina D) se utiliza para identificar células no viables mediante análisis de citometría de flujo a fin de permitir la enumeración de las células viables de interés. Las células muertas captan dicho marcador (eventos brillantes) y se excluyen de las células viables (eventos negativos) mediante la selección (consulte el Histograma 8).

Antes de analizar las muestras, debe teñirse un control preparado (células de control Stem-Trol) para verificar la reactividad de los anticuerpos.

RENDIMIENTO

Las características de rendimiento descritas se basan en el uso de reactivos Stem-Kit con un citómetro de flujo COULTER EPICS XL / XL-MCL y el software System II. Para ver ejemplos de rendimiento con un FC 500 y el software CXP, consulte la stemCXP System Guide (Guía del sistema stemCXP).

Valores esperados para los rangos de referencia

Las muestras de sangre entera normales (n = 117) se obtuvieron a partir de una población formada por hombres (n = 58) y mujeres (n = 59) para establecer un intervalo de referencia normal. Este estudio se realizó en un centro de evaluación externo. Se prepararon pruebas duplicadas para cada muestra de acuerdo con el folleto de los reactivos Stem-Kit. Se llevó a cabo un análisis y selección manuales para obtener los valores de CD45+, CD34+ y CD34 %.

Los análisis estadísticos recomiendan una distribución no gaussiana de los datos recopilados. Teniendo en cuenta esto, se empleó un método no paramétrico (robusto) para analizar los datos. Se obtuvieron los valores de CD45+, CD34+ y CD34 %. Los valores se expresan en forma de recuentos absolutos (células/ μ L) para CD45+ y CD34+, y en forma de porcentaje del recuento total de leucocitos (CD34 %) tal como se indica en la tabla siguiente.

Sangre entera normal: intervalos de referencia

Método manual (análisis robusto)	n	CD45+ (células/ μ L)				CD34+ (células/ μ L)				CD34+ (%)			
		Mín	Máx	Media	DE	Mín	Máx	Media	DE	Mín	Máx	Media	DE
Manual	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Estos valores tienen carácter meramente ilustrativo. Cada laboratorio deberá establecer sus valores esperados según la población local de donantes normales.

Linealidad

Las mediciones duplicadas se efectuaron en cada una de las diez diluciones en serie de los dos tipos de muestras: sangre entera periférica enriquecida con CD34+ y sangre entera periférica movilizada recién extraída. Se logró un rango dinámico de 0 a 2000 células/ μ L y un rango de sensibilidad más bajo de 0 a 150 células/ μ L para las concentraciones de CD34+ HPC. Las muestras se prepararon según el folleto de los reactivos Stem-Kit y se analizaron en un citómetro de flujo COULTER EPICS XL/XL-MCL. Los valores se expresan en forma de recuentos absolutos (células/ μ L). Los resultados se analizaron con arreglo a análisis de regresión lineal, comparando los recuentos absolutos previstos con los obtenidos para la media de las células CD34+ duplicadas menos endógenas. Consulte las tablas siguientes.

Las pendientes de las líneas de regresión de los gráficos de recuentos absolutos totales de CD34+ HPC reflejan la medición matemática de linealidad. Esto se ve respaldado por una desviación mínima posible del ensayo tal como muestra la intersección y para los análisis. Los recuentos absolutos previstos guardan una alta correlación con los recuentos absolutos obtenidos.

Resultados de sangre entera enriquecida con CD34+

Consulte el gráfico del Anexo.

Resultados de sangre periférica (movilizada)

Consulte el gráfico del Anexo.

**Precisión del método (tablas)
(resultados previstos frente a obtenidos)**

La precisión del método hace referencia a la correspondencia existente entre los resultados previstos y los obtenidos tanto con los métodos de análisis y selección manuales como automatizados. La sangre entera periférica normal recién extraída se enriqueció con células CD34+ purificadas hasta alcanzar una concentración de 1875 células/ μ L. Los recuentos de células se confirmaron con un hemocitómetro de Malassez y se diluyeron en serie hasta obtener diferentes concentraciones. Los resultados previstos se comparan con los resultados obtenidos para obtener la media de las mediciones duplicadas mediante los métodos de análisis y selección manuales y automatizados para cada nivel de dilución. Al comprobar la pendiente y las ordenadas en la intersección, se observa que no existe diferencia estadística entre los resultados previstos y los métodos de análisis y selección automatizados, ni entre los resultados previstos y los métodos de análisis y selección manuales.

Precisión del método - CD34+ (%)

Consulte el gráfico del Anexo.

Precisión del método - Recuento absoluto de CD34+ (células/ μ L)

Consulte el gráfico del Anexo.

Precisión del método - Total de leucocitos - CD45+ (células/ μ L)

Consulte el gráfico del Anexo.

Exactitud del método (resultados automáticos frente a resultados manuales)

El grado de precisión entre los métodos automático y manual del sistema stemONE se estudió en cuatro centros de evaluación externos con muestras de sangre entera periférica recién extraída y muestras congeladas o recién extraídas de aféresis, de sangre del cordón umbilical y de la médula ósea. Los intervalos de confianza (IC) se calcularon con límites del 95 %.

Se prepararon muestras de sangre entera periférica recién extraída (n = 59 de tres centros), productos de aféresis recién extraídos (n = 51 de tres centros), sangre del cordón umbilical recién extraída (n = 29 de dos centros), médula ósea recién extraída (n = 33 de dos centros), productos de aféresis descongelados (n = 23 de un centro), sangre del cordón umbilical descongelada (n = 31 de dos centros) y médula ósea descongelada (n = 20 de un centro) según el folleto de los reactivos Stem-Kit y, posteriormente, se analizaron en citómetros de flujo COULTER EPICS XL/XL-MCL. Se llevaron a cabo procesos de análisis y selección manuales y automatizados para obtener los valores de CD45+, CD34+ y CD34 %.

Precisión de los métodos (imágenes)

Muestras de sangre entera periférica recién extraída (n = 59)

Consulte el gráfico del Anexo.

Muestras de aféresis recién extraídas (n = 51)

Consulte el gráfico del Anexo.

Muestras de sangre del cordón umbilical recién extraída (n = 29)

Consulte el gráfico del Anexo.

Muestras recién extraídas de médula ósea (n = 33)

Consulte el gráfico del Anexo.

Muestras descongeladas de aféresis (n = 23)

Consulte el gráfico del Anexo.

Muestras descongeladas de sangre del cordón umbilical (n = 31)

Consulte el gráfico del Anexo.

Muestras descongeladas de médula ósea (n = 20)

Consulte el gráfico del Anexo.

Precisión

Precisión interlaboratorio

Se realizaron estudios en un centro clínico con tres operadores, cada uno con un citómetro de flujo diferente. Se identificaron tres muestras que representaban el rango dinámico de CD34+ (0-2000 células/ μ L):

Rango bajo:	Sangre periférica movilizada recién extraída
Rango medio:	Producto de aféresis
Rango alto:	Producto de aféresis

Estas muestras se dividieron en tres alícuotas; cada operador recibió una de cada nivel (bajo, medio, alto). Las muestras se prepararon (n = 10) a partir de cada alícuota según el folleto de los reactivos Stem-Kit. Cada operador efectuó el análisis en un citómetro de flujo EPICS XL aplicando métodos de análisis y selección manuales y automatizados para obtener los valores de CD45+, CD34+ y CD34 %. Los valores se expresan en forma de porcentaje (%) del recuento total de leucocitos y en forma de recuentos absolutos (células/ μ L).

En las tablas siguientes se muestran los resultados del estudio de precisión interlaboratorio por nivel. Los valores obtenidos para los recuentos absolutos de CD45+ y CD34+ y los porcentajes de CD34 presentaban una variación mínima teniendo en cuenta las medias, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación de las mediciones duplicadas.

Consulte el gráfico del Anexo.

Precisión intralaboratorio

Las muestras para el rango dinámico del ensayo se obtuvieron utilizando sangre entera periférica recién extraída, médula ósea recién extraída, y productos de aféresis y sangre del cordón umbilical tanto recién extraídos como descongelados procedentes de cuatro centros de evaluación externos. Diez muestras de cada se prepararon con arreglo al folleto de los reactivos Stem-Kit y se analizaron en citómetros de flujo COULTER EPICS XL/XL-MCL con métodos de análisis y selección manuales para obtener los valores de CD45+, CD34+ y CD34 %.

Los valores de CD45+, CD34+ y CD34 % de las tablas siguientes ponen de manifiesto que el método de análisis es reproducible según las medias, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación de estas mediciones. Las tablas de datos del ANEXO reflejan la precisión intralaboratorio del ensayo.

Consulte el gráfico del Anexo.

LIMITACIONES

Para conocer las limitaciones en caso de utilizar el método automatizado, consulte la stemCXP System Guide (Guía del sistema stemCXP) proporcionada con el software del sistema stemCXP.

- Las muestras teñidas y lisadas deben almacenarse en hielo y analizarse en el citómetro de flujo de acuerdo con la información de la sección «Estabilidad de la muestra procesada»; de lo contrario, los resultados podrían ser erróneos.
- No diluya ni alícuote ni refrigere los reactivos. Utilícelos tal y como se presentan.
- Los reactivos solo son válidos para su uso con un citómetro de flujo.
- Para que la tinción resulte óptima, descongele adecuadamente las muestras congeladas.
- Es posible que no se lisen todos los glóbulos rojos en las siguientes situaciones: presencia de glóbulos rojos nucleados, concentración anómala de proteínas o hemoglobinopatías. Esto puede dar lugar a una falsa reducción de los resultados de CD34 % debido a que los glóbulos rojos sin lisar se cuentan como leucocitos. Esto no debería afectar a los recuentos absolutos de CD34+ y CD45+.
- Algunos pacientes pueden presentar problemas especiales debido a los recuentos alterados o muy bajos de determinadas poblaciones celulares.
- Los resultados obtenidos con citometría de flujo pueden ser erróneos si se han establecido selecciones de manera incorrecta.
- Los reactivos Stem-Kit se han diseñado para utilizar el marcador de viabilidad 7-AAD con el fin de determinar las células HPC viables. Si en su laboratorio se emplea otro método de determinación de la viabilidad, aplique las prácticas de laboratorio recomendadas generales y los procedimientos de control de calidad de su laboratorio para garantizar la calidad de los resultados obtenidos.

MARCAS COMERCIALES

Beckman Coulter, el logotipo estilizado y las marcas de productos y servicios de Beckman Coulter aquí mencionadas son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Beckman Coulter, Inc. en Estados Unidos y otros países.

INFORMACIÓN ADICIONAL

www.beckmancoulter.com

Lista de símbolos

El glosario de símbolos está disponible en beckman.com/techdocs (número de documento B60062)

Reagentes de Stem-Kit

REF IM3630 50 testes

Para fins de diagnóstico *in vitro*

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Os reagentes Stem-Kit incluem um reagente fluorescente de duas cores (FITC, PE) de anticorpos monoclonais de murino, um controlo isoclónico de murino fluorescente de duas cores (FITC, PE), um reagente de contagem absoluta, um reagente de viabilidade celular e um reagente de lise. Destina-se «Para fins de diagnóstico *in vitro*» e para a identificação e enumeração simultâneas das percentagens de populações de células CD45+ e CD45+ CD34+ positivas duplas e contagens absolutas em espécimes biológicos por citometria de fluxo. Os espécimes biológicos incluem novo sangue total periférico normal ou mobilizado e produtos de aférese novos ou descongelados, sangue do cordão umbilical e medula óssea. As medições de populações de células podem ser obtidas utilizando um método automático ou manual para delimitação e análise.

Consulte este folheto informativo de Stem-Kit Reagents para obter instruções completas se for utilizado o método manual. Consulte o stemCXP System Guide (Manual do sistema stemCXP) fornecido com o kit de software stemCXP 2.0 e com o stemCXP versão 2.0, WIN 7 para obter instruções completas se for utilizado o método automatizado.

RESUMO

Células progenitoras hematopoiéticas (HPC)

Os reagentes Stem-Kit foram concebidos para a identificação de células progenitoras hematopoiéticas (HPC) humanas com base nos seguintes critérios: «As células CD34+ verdadeiras (a) expressam o antígeno CD34, (b) expressam o antígeno CD45 com característica de intensidade de coloração de células blásticas (ou seja, imediatamente detetáveis, mas com níveis mais baixos do que os linfócitos e monócitos) e (c) apresentam características de dispersão de luz de células blásticas com ângulo lateral baixo e ângulo frontal baixo a intermédio» (1). A exclusão de CD34+ HPC mortas da enumeração de CD34+ HPC viáveis é possível com recurso ao marcador de viabilidade 7-AAD (2).

CD34

O antígeno CD34 é uma família de glicoproteínas transmembranares de cadeia simples do tipo I, glicosiladas de forma diferencial (3, 4, 5). Expressa-se em praticamente todas as células hematopoiéticas precursoras, incluindo as células estaminais multipotentes. Os epítomos de CD34 foram separados em três classes com base na sensibilidade à neuraminidase e à protease de glicol de *Pasteurella haemolytica* (6). O anticorpo monoclonal CD34 (mAb) utilizado nos reagentes Stem-Kit é designado 581. Reconhece especificamente um epítopo da classe III da molécula CD34 (7), conforme definido pelos padrões de clivagem enzimática (6, 8). Este anticorpo monoclonal 581 foi atribuído a CD34 durante o 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5.º workshop HLDA sobre antígenos de diferenciação de leucócitos humanos), em Boston, Massachusetts, EUA, em 1993 (7).

CD45

O anticorpo CD45 reconhece membros da família CD45 de antígenos pan de leucócitos com pesos moleculares de 180, 190, 210 e 220 kD (9, 10, 11). É também conhecido como o antígeno comum de leucócitos (LCA). O antígeno CD45 expressa-se em todos os tipos de células hematopoiéticas, exceto nos eritrócitos maduros e respetivas células progenitoras imediatas (11, 12). Não foi detetado em tecido não hematopoiético diferenciado (12, 13, 14, 15). O CD45 mAb utilizado nos reagentes Stem-Kit é designado J33. Foi atribuído ao CD45 durante o 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3.º workshop HLDA sobre antígenos de diferenciação de leucócitos humanos), em Oxford, Inglaterra, em 1986 (16).

7-AAD

O marcador de viabilidade 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) é um análogo da actinomicina D que contém um grupo de aminas substituído na posição 7 do cromóforo. O marcador de viabilidade 7-AAD intercala entre bases de citosina e guanina do ADN (15). As actinomicinas são compostos biologicamente ativos com um cromóforo 2-amino-4, 6 dimetilfenoxazona-3 e dois pentapeptídeos cíclicos (17). As actinomicinas formam complexos estáveis com ácido desoxirribonucleico (ADN) bicatenário, mas não com ácido ribonucleico (ARN) bicatenário nem com híbridos de ADN-ARN ou com ADN ou ARN monocatenário (15, 18).

As propriedades espectrais do marcador de viabilidade 7-AAD tornam esta molécula particularmente adequada para a análise de citometria de fluxo (17). A absorção máxima do complexo 7-AAD/ADN situa-se na região espectral verde, pelo que é adequada para um citómetro com laser Argon (comprimento de onda de excitação de 488 nm) (15). A emissão de fluorescências vermelho-escuros do marcador de viabilidade 7-AAD (635 a 675 nm) facilita a utilização desta sonda em combinação com os anticorpos conjugados de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE), visto que, em comparação com o iodeto de propídio (PI), o complexo 7-AAD/ADN apresenta uma sobreposição espectral mínima com o FITC e a PE (17).

As células apoptóticas, necróticas e/ou danificadas causam interferência na análise de células viáveis por citometria de fluxo. As células não viáveis devem ser avaliadas e discriminadas concentrando-se na coloração positiva para 7-AAD quando as células viáveis permanecem sem coloração (negativa) (19).

Sistemas do citómetro de fluxo

Os sistemas de citometria de fluxo (FC 500) aplicam os princípios da citometria de fluxo na análise de espécimes biológicos para a identificação de várias populações de células, determinadas pelos anticorpos monoclonais específicos e fluorocromos utilizados. O presente teste utiliza os sistemas de citometria de fluxo FC 500 equipados com o software do sistema CXP para analisar amostras.

PRINCÍPIO

Este teste depende da capacidade de um anticorpo monoclonal em ligar-se à superfície de células que exprimem determinantes antigénicos discretos. O reagente CD45-FITC/CD34-PE nos reagentes Stem-Kit é uma combinação de dois anticorpos monoclonais de murino, cada qual conjugado para um determinado fluorocromo e específicos para um antígeno diferente de superfície celular. A coloração de superfície celular específica é obtida incubando amostras duplicadas de um espécime biológico com o reagente de duas cores CD45-FITC/CD34-PE.

Um teste adicional da mesma amostra é corado com o reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE para verificar a ligação não específica do anticorpo monoclonal CD34-PE. O marcador de viabilidade 7-AAD, um marcador de ácidos nucleicos que se liga a pares de bases acessíveis (ADN celular), é utilizado para distinguir células viáveis de células não viáveis. Os glóbulos vermelhos de cada amostra são submetidos a lise com solução de lise NH₄Cl preparada com uma concentração de 1X. São adicionadas Stem-Count Fluorospheres ou Flow-Count Fluorospheres (o reagente de contagem absoluta) e as células restantes são analisadas por citometria de fluxo. O controlo de processo e de qualidade do ensaio é garantido pelos reagentes de controlo de qualidade do instrumento e da amostra: as Flow-Check Fluorospheres, as Flow-Set Fluorospheres, os reagentes de compensação adequados e as Stem-Trol Control Cells.

EXEMPLOS DE APLICAÇÕES CLÍNICAS

Uma cronologia de relatórios científicos de células progenitoras hematopoiéticas (HPC) revela que estudos anteriores se baseavam em contagens de células nucleadas para quantificação. Os estudos subsequentes com ensaios de unidades de formação de colónias (CFU) forneceram estimativas aproximadas de populações de células progenitoras. Após morosos ensaios de CFU, foi descoberta a molécula de superfície de célula CD34. A CD34 foi encontrada na superfície de células hematopoiéticas precoces e de células hematopoiéticas de formação de colónias na medula óssea e no sangue periférico (20). Os anticorpos monoclonais direcionados contra a molécula CD34 foram posteriormente desenvolvidos e utilizados na citometria de fluxo. Atualmente, as determinações de CD34 por citometria de fluxo são amplamente aceites como meio de avaliação de células progenitoras e estaminais hematopoiéticas.

Na medula óssea de indivíduos normais, 1 a 3% das células que expressam o antígeno CD34 são capazes de reconstituir a hematopoiese de múltiplas linhagens a longo prazo (3, 20). No sangue periférico de indivíduos normais, menos de 0,1% das células em circulação expressam o antígeno CD34 (1, 21). A utilização dos reagentes Stem-Kit proporciona um método de citometria de fluxo simples, rápido e sensível para enumerar células progenitoras e estaminais hematopoiéticas no sangue periférico, em produtos de leucoferese, na medula óssea e no sangue do cordão umbilical.

CONTEÚDO DO REAGENTE

Os reagentes Stem-Kit contêm o seguinte:

- Reagente CD45-FITC/CD34-PE (45/34) — 1 recipiente.
 - Reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE (45/CTRL) — 1 recipiente.
 - Fluoresferas Stem-Count — 1 recipiente.
 - Marcador de viabilidade 7-AAD — 1 recipiente.
 - Solução de lise NH₄Cl com concentração de 10X — 2 recipientes.
1. Estes reagentes devem ser utilizados em conjunto, conforme fornecido no kit.

As fluoresferas Flow-Count, equivalentes às fluoresferas Stem-Count, podem ser utilizadas para determinar a contagem absoluta se for utilizada uma concentração específica ensaiada.

2. O CD45-FITC/CD34-PE é um reagente de duas cores pronto a utilizar, fornecido em 2,2 mL de solução salina tamponada de fosfato (PBS) com 2 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e 0,1% de azida sódica como conservante.
3. O CD45-FITC/IsoClonic Control-PE é um reagente de duas cores pronto a utilizar, fornecido em 1,2 mL de PBS com 2 mg/mL de BSA e 0,1% de azida sódica como conservante. O reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE é uma mistura de 581 anticorpos monoclonais não conjugados e conjugados de PE (idênticos a CD34). Esta mistura atua como um controlo isomorfológico adequado para verificação da ligação não específica de CD34-PE mAb em todas as amostras.

NOTA: Os reagentes CD45-FITC/CD34-PE e CD45-FITC/IsoClonic Control-PE não deverão ser separados. Tenha atenção ao realizar os testes e controlos, já que ambos os reagentes possuem o mesmo número de lote no rótulo do recipiente.

Resumo de características dos anticorpos

Especificidade	CD45	CD34
Clone	J33	581
Hibridoma	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Imunogénio	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Cadeia de Ig	Cadeias leves de IgG1, κ	Cadeias leves de IgG1, κ
Espécie	Rato	Rato
Conjugação	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	R-Ficoeritrina (PE)
Razão molar	5–8 moles de FITC/mole de Ig	0,5–1,5 moles de PE/mole de Ig
Comprimento de onda de excitação	488 nM (azul-verde)	488 nM (azul-verde)
Emissão de fluorescência	504 a 541 nm (maioritariamente verde)	568 a 590 nm (maioritariamente laranja)

- As fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count são compostas por microesferas fluorescentes de polistireno de 10 μm (diâmetro nominal) num meio de suspensão aquoso de 20 mL, com um surfatante e 1% de formaldeído. Cada fluoroesfera contém um corante com um intervalo de emissão de fluorescência de 525 nm a 700 nm quando estimulada a 488 nm. A concentração ensaiada (fluoroesferas/ μL) das fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count resulta de várias análises repetidas utilizando um analisador do tamanho de partículas COULTER. Este valor específico do lote encontra-se indicado no rótulo do respetivo recipiente.
- O marcador de viabilidade 7-AAD é fornecido em 99% de solução salina tamponada de fosfato (PBS: 0,01 M de fosfato de sódio, 0,145 M de cloreto de sódio, pH 7,2) com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO).
- A solução de lise NH_4Cl é fornecida como uma solução de 20 mL, com concentração de 10X. Contém uma mistura de cloreto de amónio (NH_4Cl), bicarbonato de potássio (KHCO_2), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) dissódico.

AVISOS E PRECAUÇÕES

- As preparações de anticorpos monoclonais contêm 0,1% de azida sódica. Sob condições ácidas, a azida sódica produz ácido hidrazoico, um composto extremamente tóxico. A eliminação através de sistemas de esgotos deverá ser associada a quantidades significativas de água corrente, de modo a evitar a acumulação perigosa nas tubagens de metal e potenciais explosões.
- Todas as amostras ou colheitas, assim como todo o material que entre em contacto com aquelas, deve ser manipulado como uma substância susceptível de transmitir infecções e eliminado utilizando as precauções adequadas.
- Nunca pipete com a boca e evite o contacto de amostras ou reagentes com a pele e as membranas mucosas.
- Não utilize reagentes fora do prazo de validade impresso no rótulo do respetivo recipiente.
- As fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count contêm 1% de formaldeído. Evite o contato com a pele e os olhos uma vez que o formaldeído pode causar efeitos irreversíveis nestes tecidos. Não respire os vapores. Utilize equipamento de segurança apropriado tal como luvas e proteção ocular.
- Não exponha os reagentes Stem-Kit à luz intensa ou ao calor durante o armazenamento ou a utilização.
- Evite a evaporação e a fuga de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, caso contrário, poderão ser obtidos resultados errados. Feche bem os recipientes com as tampas após a utilização e armazene na posição vertical.
- Certifique-se de que as fluoroesferas estão totalmente suspensas de novo antes de as utilizar. Evite a mistura excessiva para minimizar a formação de bolhas de ar. Não pipete bolhas de ar ou podem ocorrer resultados errados.
- Utilize uma pipeta calibrada (são preferíveis pipetas de deslocamento positivo ou de repetição) para a dispensação de amostras e de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count ou poderão ser obtidos resultados errados.
- Utilize as técnicas de pipetagem recomendadas pelo fabricante da pipeta para garantir uma pipetagem correta e precisa de amostras e de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, caso contrário, podem ser obtidos resultados errados.
- As amostras coradas e submetidas a lise devem ser armazenadas em gelo e analisadas no citómetro de fluxo de acordo com as informações da secção «Estabilidade da amostra processada», caso contrário, poderão ser obtidos resultados incorretos.
- Certifique-se de que são contadas pelo menos 1000 fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count. Caso contrário, não será efetuada a conversão automática de resultados para contagens absolutas.
- Cada lote de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count possui uma concentração específica de fluoroesferas. Certifique-se de que é utilizada a concentração ensaiada correta na determinação dos resultados de contagem absoluta.
- Métodos de preparação que exijam um passo de lavagem não devem ser utilizados devido a uma perda desconhecida de células.

15. A utilização de tempos de incubação ou mistura ou de temperaturas diferentes daqueles especificados poderá dar origem a resultados errados.
16. O marcador de viabilidade 7-AAD contém 0,005% de 7-AAD. O 7-AAD puro é potencialmente cancerígeno. Embora este composto esteja altamente diluído, é recomendável evitar o contacto com a pele e olhos e utilizar vestuário de proteção, luvas e proteção ocular/facial adequados.
17. O marcador de viabilidade 7-AAD contém 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). O DMSO puro é um irritante. Embora este composto esteja diluído, é recomendável evitar o contacto com a pele e os olhos, utilizar vestuário de proteção, luvas e proteção ocular/facial adequados.
18. Tal como um cromóforo, o 7-AAD é sensível à luz. Armazene o marcador de viabilidade 7-AAD na embalagem de cartão do kit para evitar uma exposição contínua à luz durante o armazenamento.
19. Minimizar a exposição de amostras misturadas à luz durante a incubação.
20. Respeite as boas práticas laboratoriais gerais ao manusear os reagentes.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO GHS

Fluorosferas Stem-Count

PERIGO



H316

Provoca irritação cutânea ligeira.

H317

Pode provocar uma reação alérgica cutânea.

H350

Pode causar cancro.

P201

Pedir instruções específicas antes da utilização.

P280

Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.

P308+P313

EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

P333+P313

Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.

P362+P364

Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a usar.

Formaldeído 0,5 - 1,0%

mistura reacional de:

5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona

[n.o CE 247-500-7] e

2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE

220-239-6] (3:1) < 0,05%

Corante 7-AAD para verificação de viabilidade ATENÇÃO

H316

Provoca irritação cutânea ligeira.

P332+P313

Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Dimetilsulfóxido 0,5 - 2%



A Ficha de dados de segurança está disponível em beckman.com/techdocs

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

O reagente fechado permanecerá estável até ao prazo de validade indicado no recipiente se for armazenado protegido da luz a temperaturas de 2–8 °C. Não utilize após o prazo de validade. Não congele. Os reagentes Stem-Kit permanecem estáveis durante 30 dias após a abertura do recipiente de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count. Os recipientes abertos deverão ser fechados com a tampa imediatamente após a utilização e armazenados a 2–8 °C, protegidos da luz. NÃO divida as fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count em alíquotas a partir do recipiente original.

IMPORTANTE: Existe o risco de resultados errados em caso de fuga das fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count. Uma vez abertas, as fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count devem ser armazenadas na vertical para evitar a possibilidade de fugas. Os reagentes não devem ser utilizados se forem observados sinais de fugas.

Sinais de deterioração

Poderão ocorrer sinais de deterioração nas seguintes situações:

Reagentes Stem-Kit, exceto fluoroesferas Stem-Count

- Uma alteração no aspeto normal como listado em seguida

Reagente	Aparência normal
CD45-FITC / CD34-PE	Líquido límpido, ligeiramente rosa
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Líquido límpido a ligeiramente rosa
Corante 7-AAD para verificação de viabilidade	Líquido límpido, de cor ligeiramente rosa a avermelhada
Solução de lise NH_4Cl	Líquido límpido, sem cor

Stem-Count Fluorospheres

- O surgimento de populações fluorescentes secundárias durante a aquisição com mais de 20% da população total de fluoroesferas.
- Uma variação significativa dos valores obtidos para contagens ou amostras.

IMPORTANTE: Os reagentes não deverão ser utilizados se existem indícios de deterioração porque poderão ser obtidos resultados incorretos. Contacte o seu representante local da Beckman Coulter se encontrar indícios de deterioração.

Preparação do reagente

1. Os reagentes CD45-FITC/CD34-PE e CD45-FITC/IsoClonic Control-PE de duas cores são utilizados diretamente a partir dos recipientes, sem qualquer diluição.
2. As fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count são utilizadas diretamente a partir do recipiente, sem qualquer diluição. O alumínio do vedante térmico deve ser totalmente removido do topo do frasco quando aberto pela primeira vez. São necessárias misturas adequadas. Ao manusear pela primeira vez o recipiente de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count no início do dia, misture no vortex durante 3–5 segundos.

Antes de pipetar a partir do recipiente, agite cuidadosamente, invertendo o recipiente 3–5 vezes.

Após a mistura inicial no vortex no início do dia, coloque os recipientes de fluoroesferas a 2–8 °C até voltarem a ser utilizados.

Evite a evaporação e fuga fechando bem o recipiente com a tampa após a utilização.

3. O marcador de viabilidade 7-AAD é utilizado diretamente a partir do recipiente, sem qualquer diluição.
4. A solução de lise NH_4Cl com concentração de 1X deve ser preparada diariamente: adicione nove volumes de água desionizada a um volume de solução de lise NH_4Cl com concentração de 10X. Não coloque a refrigerar. Descarte a solução de lise NH_4Cl com concentração de 1X não utilizada no final do dia.

Coloque todos os reagentes à temperatura ambiente (18–25 °C) antes da utilização.

MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Requisitos do espécime

Resumo do manuseamento de amostras:

Tipo de espécime	Método de delimitação	Temperatura de armazenamento	Idade da amostra
Aférese	Algoritmo	2–8 °C	24 horas
	Manual	2–8 °C	24 horas
Medula óssea	Algoritmo	2–8 °C	24 horas
	Manual	2–8 °C	24 horas
Sangue do cordão umbilical	Algoritmo	18–25 °C	24 horas
	Manual	18–25 °C	24 horas
Sangue total normal	Algoritmo	18–25 °C	20 horas
	Manual	18–25 °C	20 horas

Sangue total mobilizado	Algoritmo	18–25 °C	20 horas
	Manual	18–25 °C	20 horas

- Os espécimes biológicos incluem novo sangue total periférico normal ou mobilizado e produtos de aférese novos ou descongelados, sangue do cordão umbilical e medula óssea.
- As células progenitoras hematopoiéticas (HPC) manipuladas ou purificadas só podem ser analisadas com o método de delimitação manual.
- Recolha assepticamente produtos de aférese, espécimes de sangue periférico, espécimes de sangue do cordão umbilical ou espécimes de medula óssea para um tubo de recolha de sangue de vácuo esterilizado com fórmula A de ADC ou anticoagulante K3 EDTA.
- Os espécimes de sangue total e de sangue total mobilizado colhidos em tubos de anticoagulante podem ser armazenados até 20 horas à temperatura ambiente (18–25 °C) antes da coloração.
- Os espécimes de sangue do cordão umbilical colhidos em tubos de anticoagulante podem ser armazenados até 24 horas à temperatura ambiente (18–25 °C) antes da coloração.
- Produtos de aférese e amostras de medula óssea colhidos podem ser armazenados até 24 horas a 2–8 °C antes da coloração.
- Antes da preparação das amostras, certifique-se de que a concentração de glóbulos brancos (GB) não é superior a 30×10^9 GB/L. Se necessário, dilua a amostra em HBSS ou equivalente para atingir um valor médio de 15×10^9 GB/L. Registe o fator de diluição para o cálculo da contagem absoluta final de HPC.
- Concentrações de proteína baixas poderão provocar a criação de agregados de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count e indicar contagens de células absolutas elevadas incorretas. A diluição de espécimes com uma concentração de proteínas baixa deve ser realizada utilizando um tampão enriquecido com proteína.
- Todos os espécimes deverão ser processados com reagentes Stem-Kit, incluindo o marcador de viabilidade 7-AAD.

Procedimento de Tratamento das Amostras

Efetue os testes em duplicado, em conformidade com as «The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry» (Orientações da ISHAGE para a determinação de células CD34+ por citometria de fluxo) (1).

NOTA: Para o processamento das células de controlo Stem-Trol, consulte o folheto informativo das células de controlo Stem-Trol para obter instruções completas se for utilizado o método manual. Consulte o stemONE System Guide (Manual do sistema stemONE) fornecido com o software do sistema stemONE ou o stemCXP System Guide (Manual do sistema stemCXP) fornecido com o software do sistema stemCXP para obter instruções completas se for utilizado o método de análise automático.

- Para cada amostra de espécime, rotule três tubos de amostra da seguinte forma:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
- Pipete 20 µL do reagente CD45-FITC/CD34-PE nos tubos de amostra 45/34/7-AAD #1 e 45/34/7-AAD #2.
- Pipete 20 µL do reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE no tubo de amostra: 45/CTRL/7-AAD.
- Pipete 20 µL de marcador de viabilidade 7-AAD em todos os tubos de amostra.

IMPORTANTE: Risco de lise incompleta se um existir espécime de sangue na parte superior ou lateral do tubo de ensaio. Proceda com cuidado ao pipetar para impedir que o sangue toque na parte superior ou lateral do tubo de ensaio. Limpe o tubo de amostra com um cotonete, se necessário, para eliminar todos os vestígios de espécime de sangue das partes superior ou lateral do tubo de ensaio.

- Utilizando uma pipeta de deslocamento positivo ou de repetição, pipete 100 µL da amostra do paciente no tubo de amostra.
- Vortexar o tubo imediatamente durante 5 segundos.
- Incube todos os tubos de amostra à temperatura ambiente (18–25 °C) durante 20 minutos, protegidos da luz.
- Após a incubação, adicione 2 mL de solução de lise NH₄Cl com concentração de 1X preparada a cada tubo de amostra e misture de imediato no vortex durante 5 segundos.

NOTA: Para obter detalhes sobre a preparação da solução de lise, consulte a secção 7.2 acima, intitulada PREPARAÇÃO DO REAGENTE.

IMPORTANTE: Risco de resultados errados se forem pipetadas bolhas de ar. Misturar excessivamente fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count pode criar bolhas de ar. Não misture excessivamente as fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count nem pipete bolhas de ar para os tubos de amostra.

9. Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos, ao abrigo da luz.
10. Misture cuidadosamente as fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count invertendo o recipiente 3 a 5 vezes antes de utilizar.
11. Antes da aquisição e imediatamente após o passo 9, utilizando uma pipeta de deslocamento positivo ou de repetição, pipete 100 µL de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count em cada um dos três tubos.
12. Misture imediatamente cada tubo de amostra no vortex durante 5 segundos.

NOTA: Para obter detalhes sobre a preparação da solução de lise, consulte a secção 7.2 acima, intitulada PREPARAÇÃO DO REAGENTE.

Resumo da coloração de espécimes

Reagentes/amostras	45/34/7-AAD #1	Rótulo do tubo de ensaio 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
Corante 7-AAD para verificação de viabilidade	20 µL	20 µL	20 µL
Amostra	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex — Incubar à temperatura ambiente durante 20 minutos. Proteger da luz.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vortex — Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Proteger da luz.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex			
Para produtos de aférese, amostras de sangue do cordão umbilical e amostras de medula óssea colhidos, não espere mais de 60 minutos no gelo antes da aquisição.			
Para amostras de sangue total e sangue total mobilizado, não espere mais de 45 minutos no gelo antes da aquisição.			
Analise a amostra descongelada imediatamente.			
Proteger da luz			

Estabilidade da amostra processada:

- Para produtos de aférese, amostras de sangue do cordão umbilical e amostras de medula óssea colhidos, após a adição de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, não espere mais de 60 minutos no gelo antes da aquisição.
- Para amostras de sangue total e sangue total mobilizado, após a adição de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, não espere mais de 45 minutos no gelo antes da aquisição.
- Para a amostra congelada, a aquisição deve ser feita imediatamente após a adição de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count.
- As amostras processadas devem ser armazenadas em gelo protegido da luz e deve limitar a exposição a RT o tanto quanto possível durante a aquisição.

CONTEÚDO

A azida sódica utilizada como conservante pode formar compostos explosivos em sistemas de canalizações metálicas. Consulte o boletim do NIOSH: Explosive Azide Hazards (Perigos de explosão da azida) (16-8-76).

Para evitar a possível acumulação de compostos de azida, enxague as condutas de resíduos com água após a eliminação do reagente não diluído. A eliminação de azida sódica deve ser efetuada de acordo com os regulamentos locais adequados.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS COM O KIT:

1. Água desionizada.
2. Solução salina equilibrada de Hank (HBSS) ou equivalente
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).

4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Como alternativa a Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
9. Banho de água gelada
10. Tubos de ensaio de plástico (12 x 75 mm)
11. Pipeta de repetição calibrada (20 µL, 100 µL, 2 mL) e pontas ou pipetas de deslocamento positivo calibradas (20 µL, 100 µL, 2 mL) e pontas
12. Pipetas standard aferidas (20 µL, 100 µL, 2 mL) e pontas.
13. Agitador tipo centrifugadora (Vortex).
14. Cronómetro.
15. Citómetro de fluxo.
16. Kit de software stemCXP 2.0, stemCXP versão 2.0, WIN 7, APENAS para análises automatizadas de amostras num sistema de citometria de fluxo FC 500 equipado com o software CXP (versão 2.0).

RESULTADOS

Configuração do protocolo de análise

O citómetro de fluxo deve estar equipado para detetar forward scatter (dispersão frontal), side scatter (dispersão lateral) e quatro canais de fluorescência. Para o canal FL3 (para monitorização de Stem-Count Fluorospheres ou Flow-Count Fluorospheres) utilize um filtro passa-banda de 620 nm. Para o canal FL4 (para monitorização do marcador de viabilidade 7-AAD) utilize um filtro de passagem de onda longa de 675 nm.

Certifique-se de que o citómetro de fluxo se encontra corretamente alinhado e normalizado quanto à intensidade de fluorescência.

Certifique-se de que o citómetro de fluxo está devidamente regulado para a compensação da fluorescência.

NOTA: Para a análise de espécimes, todas as posições de regiões são aproximadas até ao fim da aquisição do tubo de amostra 45/34/7-AAD #1. As regiões são otimizadas de acordo com o seguinte protocolo e NÃO são posteriormente ajustadas para o segundo e terceiro tubos de amostra no painel.

Uma série de 8 histogramas e um esquema de delimitação deverão ser seguidos na análise de espécimes (ver abaixo). A mesma série de 8 histogramas e o esquema de delimitação deverão ser seguidos na utilização de células de controlo CD34+. As regiões A, B, C e D (consulte o título «Criação de regiões» para obter a definição das regiões) deverão ser adaptadas para incluir o aglomerado de características das células de controlo CD34+.

Criação dos Histogramas:

Crie histogramas da seguinte forma:

1. Crie o Histograma 1 como FL1 CD45-FITC vs. Side scatter (Dispersão lateral).
2. Crie o Histograma 2 como FL2 CD34-PE vs. Side scatter (Dispersão lateral).
3. Crie o Histograma 3 como FL1 CD45-FITC vs. Side scatter (Dispersão lateral).
4. Crie o Histograma 4 como Forward Scatter (Dispersão frontal) vs. Side Scatter (Dispersão lateral).
5. Crie o Histograma 5 como FL1 CD45-FITC vs. FL2 CD34-PE.
6. Crie o Histograma 6 como Forward Scatter (Dispersão frontal) vs. Side Scatter (Dispersão lateral).
7. Crie o Histograma 7 como Time (Tempo) vs. Fluoroesferas FL3 Stem-Count ou Flow-Count.
8. Crie o Histograma 8 como marcador de viabilidade FL4 7-AAD vs. Side Scatter (Dispersão lateral).

Os Histogramas 1 a 4 destinam-se a caracterizar CD34+ HPC, um processo que pode ser adiado até à etapa de análise. Estes primeiros quatro histogramas estão configurados de acordo com as The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (Orientações da ISHAGE para a determinação de células CD34+ por citometria de fluxo) (1, 2). Os Histogramas 5 a 7 servem para monitorizar parâmetros que são importantes durante a etapa de aquisição. Estes incluem o discriminador de dispersão frontal, o número de eventos CD45+ a serem recolhidos e a acumulação correta de singletos de fluoroesferas.

O Histograma 8 destina-se a analisar e a distinguir eventos viáveis de eventos não viáveis.

Criação das Regiões

Crie regiões da seguinte forma:

1. Histograma 1 — Crie uma Região A retilínea no Histograma 1 para incluir todos os leucócitos CD45+ e eliminar plaquetas, resíduos de glóbulos vermelhos e aglomerados.
2. Histograma 1 — Crie uma Região E amorfa no Histograma 1 para incluir os linfócitos (CD45 com brilho, dispersão lateral baixa).
3. Histograma 2 — Crie uma Região B retilínea no Histograma 2 para incluir todos os eventos CD34+. Defina uma paragem de contagem a 75 000 eventos (eventos CD45+) para o Histograma 2.
4. Histograma 3 — Crie uma Região C amorfa no Histograma 3 para incluir todos os eventos CD45dim aglomerados.
5. Histograma 4 — Crie uma Região D amorfa no Histograma 4 para incluir todos os eventos aglomerados com dispersão lateral intermédia e dispersão frontal intermédia a elevada.
6. Histograma 5 — Crie uma Região I Quadstat no Histograma 5 para verificar o limite inferior da expressão de CD45 em eventos CD34+.
7. Histograma 5 — Crie uma Região H amorfa no Histograma 5 para cercar todas as fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, incluindo dupletos. A Região H deverá estar localizada no canto superior direito do Histograma 5.

NOTA: Certifique-se de que a Região H está definida como uma região AMORPHOUS (Amorfa).

8. Histograma 5 — Crie a Região K retilínea (denominada «listgate – ») no Histograma 5. Defina os limites da Região K na primeira década logarítmica do histograma de dois parâmetros. Esta Região K permite a eliminação de eventos duplamente negativos durante a aquisição para analisar 75 000 eventos CD45+ relevantes.
9. Histograma 6 — Copie a Região D do Histograma 4 para que apareça como Região F no Histograma 6.
10. Histograma 7 — Crie uma Região G retilínea no Histograma 7 para incluir apenas os singletos das fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count. A Região G pode ser identificada como «CAL» (Calibração) para permitir o cálculo automático de números absolutos de CD34+ HPC (consulte o manual do instrumento para obter mais detalhes).
11. Histograma 8 — Crie uma Região J retilínea no Histograma 8 para incluir leucócitos viáveis (eventos negativos do marcador de viabilidade 7-AAD).

Criação das Janelas de Análise

Crie delimitações da seguinte forma:

1. Histograma 1 — Atribua «J» ao Histograma 1 para mostrar todos os eventos viáveis. Se não for utilizado o 7-AAD, atribua a Região «H» ao Histograma 1 para apresentar todos os eventos, à exceção de todas as fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, incluindo dupletos.
2. Histograma 2 — Atribua «AJ» («A» se 7-AAD não for utilizado) ao Histograma 2 para apresentar os eventos CD34+ viáveis (totais, se o 7-AAD não for utilizado).
3. Histograma 3 — Atribua «A», «B» e «J» («A» e «B» se 7-AAD não for utilizado) ao Histograma 3 para exibir todos os eventos CD45+/CD34+ viáveis (totais, se o 7-AAD não for utilizado).
4. Histograma 4 — Atribua «A», «B», «C» e «J» («A», «B» e «C» se 7-AAD não for utilizado) ao Histograma 4 para exibir os eventos CD45+/CD34+ aglomerados viáveis (totais, se o 7-AAD não for utilizado) com dispersão lateral baixa, excluindo plaquetas e resíduos. Os eventos da Região ABCDJ são CD34+HPC viáveis verdadeiros.
5. Histograma 5 — Não delimitado para apresentar todos os eventos.
6. Histograma 6 — Atribua «EJ» («E» se 7-AAD não for utilizado) ao Histograma 6 para apresentar os linfócitos viáveis (totais, se o 7-AAD não for utilizado) como uma verificação visual no discriminador.
7. Histograma 7 — Atribua «H» ao Histograma 7 para mostrar todas as fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, incluindo dupletos.
8. Histograma 8 — Atribua «A» ao Histograma 8 para mostrar eventos CD45+.

Configuração da citometria de fluxo

1. Verifique se o citómetro de fluxo se encontra corretamente alinhado e otimizado para dispersão de luz e intensidades de fluorescência dos detetores FL1, FL2, FL3 e FL4, conforme as orientações do fabricante e do laboratório. Verifique se a compensação de cor está configurada para funcionamento normal. Consulte o manual do instrumento para obter instruções adicionais.
2. Misture os tubos de ensaio durante 5 segundos.
3. Efetue a aquisição de dados no citómetro de fluxo. Devem ser analisados, no mínimo, 75 000 eventos CD45+.

4. Na análise de espécimes: ajuste o discriminador e as regiões analisando o tubo de amostra 45/34/7-AAD #1. Grave o protocolo e analise os tubos de amostra 45/34/7-AAD #2 e 45/CTRL/7-AAD sem ajustes adicionais.

Exemplo de Análise

Os histogramas mostrados no ANEXO são apresentados em ordem numérica ascendente conforme apresentado no protocolo.

Cálculo de CD34+ HPC para espécime

O número de CD34+ HPC é calculado como a média dos resultados estatísticos da região D para as duas amostras repetidas (ou seja, 45/34/7-AAD #1 e 45/34/7-AAD #2).

Os resultados de CD34+ HPC são considerados válidos se os resultados obtidos pelo reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE forem inferiores a 10% dos resultados de CD34+ HPC.

1. Calcule a média dos resultados obtidos dos tubos de amostra 45/34/7-AAD #1 e 45/34/7-AAD #2 para cada espécime (ou seja, a média dos resultados impressos das estatísticas da Região D). O número de CD34+ HPC poderá situar-se a 10% da média para as amostras duplicadas. O valor obtido com o tubo de amostra de controle 45/CTRL/7-AAD deverá representar menos de 10% do valor médio obtido a partir dos tubos de ensaio para que os resultados sejam validados.

NOTAS:

Se a média da contagem absoluta obtida para o duplicado CD34+ HPC se encontrar fora do intervalo aceite (ou seja, se exceder 10%), determine se a pipetagem foi realizada corretamente, especialmente no caso das fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count. Verifique visualmente os relatórios do citômetro de fluxo e a qualidade dos processos de coloração e lise nos tubos de ensaio. Verifique a forma como os limites de região foram definidos.

Se o valor obtido com o 45/CTRL/7-AAD ultrapassar o intervalo de valores aceites (ou seja, se exceder 10% da média de contagem absoluta obtida para o duplicado), determine se a pipetagem foi realizada corretamente, especialmente no caso das fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count. Verifique visualmente os relatórios do citômetro de fluxo e a qualidade dos processos de coloração e lise nos tubos de ensaio. Verifique a forma como os limites de região foram definidos.

Se necessário, repita o passo de aquisição adicionando um tubo de amostra BLANK após o primeiro tubo de amostra duplicado 45/34/7-AAD #1 e #2 e antes do tubo de amostra 45/CTRL/7-AAD. Se necessário, repita toda a preparação com os tubos de amostra mais recentes adicionado o tubo de amostra BLANK. Adquira e analise as séries de tubos de amostra nova e anterior. Compare os dois resultados. Se não houver concordância, contacte o seu representante local da Beckman Coulter.

2. Se a amostra foi diluída, o resultado obtido acima DEVE ser multiplicado pelo fator de diluição adequado (Dil). O resultado final obtido é a contagem absoluta de CD34+ HPC (células/ μ L).

Contagem absoluta de CD34+ HPC (células/ μ L) = Resultado impresso da contagem absoluta de CD34+ HPC (células/ μ L) x Dil

3. Para os kits de aférese, é possível utilizar a seguinte fórmula para calcular o número total de CD34+ HPC por kit:

Número total de CD34+ HPC por kit = Contagem absoluta de CD34+ HPC (células/ μ L) x 10^6 x volume do kit (L)
--

Na qual:

4. Para obter a percentagem de CD34+ HPC no cálculo do valor de leucócitos CD45+, consulte a seguinte fórmula:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Contagem absoluta de CD34+ HPC (células}/\mu\text{L)} \text{ (ou seja, resultados impressos da região D)}}{\text{Contagem absoluta de leucócitos CD45+ (células}/\mu\text{L)} \text{ (ou seja, resultados impressos da Região A)}} \times 100$$

CONTROLO DE QUALIDADE

Verifique se o citômetro de fluxo se encontra devidamente alinhado, de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante, tal como descritas nos manuais do instrumento. As intensidades-alvo foram estabelecidas para otimizar as definições de dispersão de luz e do instrumento de fluorescência para análise de amostras coradas com o reagente de anticorpos monoclonais CD45-FITC/CD34-PE e o reagente CD45-FITC/Isoclonic Control-PE.

Os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), a ficoeritrina (PE) e o marcador 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) emitem em diferentes comprimentos de onda, mas apresentam alguma sobreposição espectral que deve ser corrigida por compensação eletrônica. Os níveis de compensação ideais podem ser estabelecidos analisando, num histograma de dois

parâmetros, uma amostra de sangue total misturada com Stem-Trol Control Cells coradas com o marcador de viabilidade 7-AAD e os reagentes de compensação adequados ao utilizar o software CXP. Nesta análise, são feitos ajustes para garantir que não ocorrerá qualquer coloração no quadrante de coloração dupla com nenhum fluorocromo individual.

O marcador de viabilidade 7-AAD (7-Aminoactinomomicina D) é utilizado para identificar células não viáveis através de análise de citometria de fluxo, de modo a permitir a enumeração das células viáveis de interesse. O marcador é eliminado pelas células mortas (eventos com brilho), que são excluídas das células viáveis (eventos negativos) por delimitação (consulte o Histograma 8).

Antes de as amostras serem analisadas, deverá ser corado um controlo ensaiado (células de controlo Stem-Trol) para verificar a reatividade dos anticorpos.

DESEMPENHO

As características de desempenho fornecidas baseiam-se nos reagentes Stem-Kit utilizados com um citómetro de fluxo COULTER EPICS XL/XL-MCL com software System II. Para visualizar exemplos de desempenho num FC 500 com software CXP, consulte o stemCXP System Guide (Manual do sistema stemCXP).

Valores esperados para intervalos de referência

Foram recolhidos espécimes normais de sangue total (n = 117) de uma população de indivíduos do sexo masculino (n = 58) e do sexo feminino (n = 59) para estabelecer um intervalo de referência normal. Este estudo foi efetuado em instalações de avaliação externas. Foram preparados testes repetidos para cada espécime de acordo com o folheto informativo dos reagentes Stem-Kit. A delimitação e análise manuais foram realizadas para obter valores de CD45+, CD34+ e CD34%.

A análise estatística sugere uma distribuição não gaussiana dos dados recolhidos. Com base nestas conclusões, foi utilizada uma abordagem (expressiva) não paramétrica para analisar os dados. Foram obtidos valores de CD45+, CD34+ e CD34%. Os valores são expressos em termos de contagens absolutas (células/µL) para CD45+ e CD34+ e em percentagem da contagem total de leucócitos (CD34%), conforme demonstrado na tabela seguinte.

Sangue total normal: intervalos de referência

Método manual (análise expressiva)	n	CD45+ (células/µL)				CD34+ (células/µL)				CD34+ (%)			
		Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP
Manual	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Estes valores são apenas representativos. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores esperados a partir da população local de dadores normais.

Linearidade

Foram efetuadas medições repetidas em cada uma de 10 diluições em série para 2 tipos de amostras: sangue total periférico misturado com CD34+ e novo sangue total periférico mobilizado. Foi atingido um intervalo dinâmico de 0 a 2000 células/µL e um intervalo de sensibilidade em valores baixos de 0 a 150 células/µL para concentrações de CD34+ HPC. As amostras foram preparadas de acordo com o folheto informativo dos reagentes Stem-Kit e analisadas num citómetro de fluxo COULTER EPICS XL/XL-MCL. Os valores são expressos como contagens absolutas (células/µL). Os resultados foram analisados em termos de análises de regressão linear para contagens absolutas esperadas vs. obtidas para a média das células CD34+ menos endógenas das repetições. Consulte as seguintes tabelas.

Os declives das linhas de regressão fornecidos com os gráficos para as contagens absolutas totais de CD34+ HPC apresentam a medição matemática de linearidade. Tal é suportado pela tendência do ensaio de potencial mínimo, conforme evidenciado pelas interceções y para as análises. As contagens absolutas esperadas demonstram uma elevada correlação com as contagens absolutas obtidas.

Resultados de sangue total misturado com CD34+

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Resultados de sangue periférico (mobilizado)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Exatidão do método (tabelas) (resultados esperados vs. resultados obtidos)

A exatidão do método é definida como o grau de coincidência entre os resultados esperados e os resultados obtidos para ambos os métodos de delimitação e análise manuais e automáticos. O novo sangue total periférico normal foi misturado com células CD34+ purificadas a um nível de 1875 células/µL. As contagens de células foram confirmadas por um hemacitómetro de Malassez e diluídas em série em diferentes concentrações. Os resultados esperados são comparados com os resultados obtidos para a média de medições duplicadas utilizando delimitação e análise manuais e automáticas para cada nível de diluição. Os testes relativos a declive e ordenadas na interceção não apresentam qualquer diferença estatística entre a

delimitação e a análise automáticas e os resultados esperados, nem entre a delimitação e a análise manuais e os resultados esperados.

Exatidão do método — CD34+ (%)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Exatidão do método — Contagem absoluta de CD34+ (células/ μ L)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Exatidão do método — Total de leucócitos — CD45+ (células/ μ L)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Exatidão do método (resultados automatizados vs. manuais)

O grau de exatidão dos métodos automático e manual do sistema stemONE foi estudado em quatro locais diferentes de avaliação externa, com recurso a novo sangue total periférico e a espécimes de aférese, sangue do cordão umbilical e medula óssea novos ou descongelados. Os intervalos de confiança (IC) foram calculados com limites de 95%.

Foram preparados espécimes de novo sangue total periférico (n = 59 de três locais), novos produtos de aférese (n = 51 de três locais), novo sangue do cordão umbilical (n = 29 de dois locais), nova medula óssea (n = 33 de dois locais), produtos de aférese descongelados (n = 23 de um local), sangue do cordão umbilical descongelado (n = 31 de dois locais) e medula óssea descongelada (n = 20 de um local) de acordo com o folheto informativo dos reagentes Stem-Kit e analisados nos citómetros de fluxo COULTER EPICS XL/XL-MCL. Foi realizada uma delimitação e análise manuais e automáticas para obter valores de CD45+, CD34+ e CD34%.

Exatidão dos métodos (valores)

Espécimes de novo sangue total periférico (n = 59)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Espécimes de nova aférese (n = 51)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Espécimes de novo cordão umbilical (n = 29)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Espécimes de nova medula óssea (n = 33)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Espécimes de aférese descongelados (n = 23)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Espécimes de sangue do cordão umbilical congelados (n = 31)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Espécimes de medula óssea descongeladas (n = 20)

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Precisão

Precisão interlaboratorial

Foram efetuados estudos numa clínica por três operadores, cada um utilizando um citómetro de fluxo diferente. Foram identificados três espécimes que representam o intervalo dinâmico de CD34+ (0–2000 células/ μ L):

- Intervalo baixo: novo, sangue periférico mobilizado
- Intervalo médio: produto de aférese
- Intervalo elevado: produto de aférese

Estes espécimes foram divididos em três alíquotas e foi fornecida uma alíquota de cada nível (baixo, médio, elevado) a cada um dos três operadores. As amostras foram preparadas (n = 10) a partir de cada alíquota de acordo com o folheto informativo dos reagentes Stem-Kit. Cada operador efetuou uma análise num citómetro de fluxo EPICS XL utilizando delimitação e análise automáticas e manuais para obter valores de CD45+, CD34+ e CD34%. Os valores são expressos em percentagem (%) da contagem de leucócitos totais e como contagens absolutas (células/ μ L).

Os resultados do Interlaboratory Precision Study (Estudo de precisão interlaboratorial) por nível são fornecidos nas seguintes tabelas. Os valores obtidos para as contagens absolutas de CD45+ e CD34+ e percentagens de CD34 apresentaram reduzida variação, conforme evidenciado pelas médias, pelos desvios-padrão e pelos coeficientes de variação para as medições repetidas.

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

Precisão intralaboratorial

Os espécimes que abrangem o intervalo dinâmico do ensaio foram obtidos utilizando sangue total periférico novo, medula óssea nova, aférese e sangue do cordão umbilical novos e descongelados de quatro locais de avaliação externa. Foram preparadas dez amostras de cada de acordo com o folheto informativo dos reagentes Stem-Kit e analisadas nos citômetros de fluxo COULTER EPICS XL/XL-MCL utilizando delimitação e análise manuais para obter os valores de CD45+, CD34+ e CD34%.

Os valores de CD45+, CD34+ e CD34% indicados nas seguintes tabelas demonstram que o método de análise é reprodutível, conforme evidenciado pelas médias, pelos desvios padrão e coeficientes de variação para estas medições. As tabelas de dados apresentadas no ANEXO demonstram a precisão intralaboratorial para o ensaio.

Consulte o Anexo para visualizar o gráfico.

LIMITAÇÕES

Consulte o stemCXP System Guide (Manual do sistema stemCXP) fornecido com o software do sistema stemCXP para consultar as limitações se for utilizado o método automatizado.

- As amostras coradas e submetidas a lise devem ser armazenadas em gelo e analisadas no citómetro de fluxo de acordo com as informações da secção «Estabilidade da amostra processada», caso contrário, poderão ser obtidos resultados incorretos.
- Estes reagentes não devem ser diluídos, divididos em alíquotas ou congelados. Utilize apenas conforme fornecido de origem.
- Os reagentes destinam-se apenas a utilização na citometria de fluxo.
- Descongele espécimes congelados corretamente para garantir uma coloração ideal.
- É possível que nem todos os glóbulos vermelhos sejam submetidos a lise, caso se verifiquem as seguintes condições: presença de glóbulos vermelhos nucleados, concentração proteica anormal ou hemoglobinopatias. Estas circunstâncias podem dar origem a resultados de CD34% falsamente diminuídos devido à contagem de glóbulos vermelhos não lisados como leucócitos. As contagens absolutas de CD34+ e CD45+ não deverão ser afetadas.
- Alguns pacientes poderão apresentar problemas especiais devido a valores de determinadas populações celulares demasiado baixos ou alterados.
- Os resultados obtidos com a citometria de fluxo podem ser incorretos se as delimitações estiverem indevidamente definidas.
- Os reagentes Stem-Kit foram concebidos para utilizar o marcador de viabilidade 7-AAD a fim de determinar as células HPC viáveis. Se o laboratório utiliza habitualmente um método de determinação da viabilidade alternativo, respeite as boas práticas laboratoriais gerais e os procedimentos de controlo de qualidade do seu laboratório para garantir a qualidade dos resultados comunicados.

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logótipo estilizado e as marcas de produtos e serviços da Beckman Coulter mencionadas neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registadas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e noutros países.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

www.beckmancoulter.com

Legenda dos símbolos

O Glossário de símbolos está disponível em beckman.com/techdocs (número do documento B60062)

Stem-Kit reagenser

REF IM3630 50 tests

Til *in vitro*-diagnostisk brug

TILSIGTET BRUG

Stem-Kit reagenser består af tofarvet fluorescerende (FITC, PE), murin, monoklonal antistofreagens, en tofarvet, murin, fluorescerende (FITC, PE) isoklonikontrol, en reagens for absolut tælling, en reagens for cellelevedygtighed samt en lyseringsreagens. Det er beregnet "Til In Vitro diagnostisk brug" til simultan identifikation og optælling af CD45+ og dobbeltpositive CD45+ CD34+ cellepopulationsprocenter og absolutte tællinger i biologiske præparater med flowcytometri. Biologiske præparater omfatter frisk, normal eller mobiliseret, perifert fuldblod og friske eller optøede afereseprodukter, navlesnorsblod og knoglemarv. Cellepopulationsmålinger kan opnås ved brug af enten en automatiseret metode eller en manuel metode for gating og analyse.

Se denne indlægsseddel til Stem-Kit Reagents for fuldstændige instruktioner, hvis den manuelle metode anvendes. Se stemCXP System Guide (stemCXP-systemvejledningen), som følger med stemCXP 2.0-softwarekittet og stemCXP version 2.0, WIN 7 for komplette instruktioner, hvis den automatiske metode anvendes.

RESUMÉ

Hæmatopoietiske progenitorceller (HPC)

Stem-Kit-reagenser er udviklet til at identificere humane hæmatopoietiske progenitorceller (HPC) ved brug af følgende kriterier: "Sande CD34+ celler (a) udtrykker CD34-antigen, (b) udtrykker CD45-antigen med udviklede cellers karakteristika for farvningsintensitet (dvs. lette at detektere, men på lavere niveauer end lymfocytter og monocytter) og (c) udviser udviklede cellers lave sidevinkel og lave til middel karakteristika for let spredning med forlæns vinkel" (1). Eksklusion af død CD34+ HPC fra brugbar CD34+ HPC-optælling opnås med 7-AAD levedygtighedsfarvestof (2).

CD34

CD34-antigenet er en række forskelligt glykosyleret type I transmembran enkeltkædede glykoproteiner (3, 4, 5). Det udtrykkes på stort set alle hæmatopoietiske forløberceller inklusive multipotente stamceller. CD34-epitoper er blevet separeret i tre klasser baseret på følsomheden over for neuraminidase og for pasteurella hæmolyticaglykoprotease (6). Det monoklonale CD34-antistof (mAb), der anvendes i Stem-Kit-reagenserne, kaldes 581. Det genkender specifikt en klasse III epitop af CD34-molekylet (7) som defineret af enzymatiske spaltningsmønstre (6, 8). Dette 581 monoklonale antistof blev tildelt CD34 på den 5. HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens i Boston, Massachusetts, USA, i 1993 (7).

CD45

CD45-antistof genkender medlemmer af CD45-serien af pan-leukocytantigener med molekyelvægte på 180, 190, 210, og 220 kD (9, 10, 11). Det kaldes også fælles leukocytantigen (LCA). CD45-antigen udtrykkes på hver type hæmatopoietisk celle undtagen modne erythrocytter og deres nærmeste progenitorer (11, 12). Det er ikke blevet detekteret i differentierede ikke-hæmatopoietisk væv (12, 13, 14, 15). CD45-mAb anvendt i Stem-Kit-reagenser kaldes J33. Det blev tildelt CD45 på den 3. HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens i Oxford, England, i 1986 (16).

7-AAD

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) levedygtighedsfarvestof er en analog af actinomycin D, der indeholder en substitueret aminogruppe på 7-positionen i kromoforen. 7-AAD levedygtighedsfarvestof indskydes mellem cytosin og guaninbaser af DNA'et (15). Actinomyciner er biologisk aktive forbindelser, der indeholder en 2-amino-4, 6 dimethylphenoxazon-3 kromofor og to cykliske pentapeptider (17). Actinomyciner udgør stabile komplekser med dobbeltstregnet deoxyribonucleinsyre (DNA), men hverken med dobbeltstregnet ribonucleinsyre (RNA) eller RNA-DNA-hybrider eller med enkeltstregnet DNA eller RNA (15, 18).

De spektrale egenskaber i 7-AAD levedygtighedsfarvestoffet gør dette molekyle særligt velegnet til flowcytometrianalyser (17). Den maksimale absorption i 7-AAD-/DNA-komplekset findes i den grønne spektralregion og er således velegnet til et cytometer udstyret med en argonlaser (excitationsbølgelængde på 488 nm) (15). Den dybt røde fluorescensemission fra 7-AAD levedygtighedsfarvestoffet (635 til 675 nm) gør brugen af denne sonde nemmere kombineret med fluorescein-isothiocyanat (FITC) og fykoerythrin (PE) konjugerede antistoffer, fordi 7-AAD / DNA-komplekset, i modsætning til propidiumiodid (PI), udviser minimal spektraloverlappning med FITC og PE (17).

Apoptotiske, nekrotiske celler og/eller beskadigede celler er kilder til interferens i analysen af brugbare celler med flowcytometri. Ikke-brugbare celler skal evalueres og diskrimineres ved at fokusere på 7-AAD-positiv farvning, når brugbare celler forbliver ufarvede (negativ) (19).

Flowcytometersystemer

Flowcytometersystemer (FC 500) anvender principperne for flowcytometri til at analysere biologiske præparater for at identificere forskellige cellepopulationer bestemt af de specifikke monoklonale antistoffer og fluorokromer, der bruges. Du nuværende test anvender FC 500 flowcytometersystemer, der er udstyret med CXP-systemsoftware til at analysere prøver.

PRINCIP

Denne test afhænger af et monoklonalt antistofs evne til at binde sig til cellers overflade og udtrykke diskrete antigendeterminanter. CD45-FITC / CD34-PE-reagenset i Stem-Kit-reagenser er en kombination af to murine, monoklonale antistoffer. Hver af dem konjugeret til et specifikt fluorokrom og specifik for et andet celleoverfladeantigen. Specifik celleoverfladefarvning opnås ved at inkubere duplikatprøver af et biologisk præparat med det tofarvede CD45-FITC / CD34-PE-reagens.

En anden test fra samme prøve farves med CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagens for at kontrollere den ikke-specifikke binding af det monoklonale CD34-PE-antistof. 7-AAD levedygtighedsfarvestof, en nukleinsyrefarve, der binder sig til tilgængelige basepar (cellulær DNA), anvendes til at skelne mellem brugbare og ikke-brugbare celler. De røde blodceller i hver prøve lyseres med NH₄Cl lyseringsopløsning klargjort på 1X. Stem-Count fluorosfærer eller Flow-Count fluorosfærer (reagenset for absolut tælling) tilsættes, og de resterende celler analyseres med flowcytometri. Proceskontrol og kvalitetskontrol, for analysen, leveres af instrumentet og reagenser til kontrol af prøvekvaliteten: Flow-Check fluorosfærer, Flow-Set fluorosfærer, hensigtsmæssige kompensationsreagenser samt Stem-Trol Control Cells.

EKSEMPLER PÅ KLINISKE ANVENDELSER

En kronologi af videnskabelige rapporter over hæmatopoietiske progenitorceller (HPC) viser, at tidlige studier anvendte kerneholdige celletællinger til kvantificering. Efterfølgende studier, der involverede analyser af kolonidannende enheder (CFU) gav omtrentlige, tilnærmede værdier af progenitorcellepopulationer. De tidsintensive CFU-analyser blev fulgt af opdagelsen af CD34-celleoverflademolekylet. CD34 viste sig at være til stede på overfladen af tidlige hæmatopoietiske celler og hæmatopoietiske kolonidannende celler i knoglemarv og perifert blod (20). Monoklonale antistoffer rettet mod CD34-molekylet blev så udviklet og anvendt i flowcytometri. CD34-bestemmelser med flowcytometri accepteres nu generelt som et middel til at vurdere hæmatopoietiske progenitor- og stemceller.

I knoglemarv fra raske personer kan 1 til 3 % af cellerne, der udtrykker CD34-antigenet, rekonstituere langsigtet flerlinjet hæmatopoiese (3, 20). I det perifere blod hos raske personer udtrykker mindre end 0,1 % af de cirkulerende celler CD34-antigenet (1, 21). Brugen af Stem-Kit-reagenser giver en enkel, hurtig og følsom flowcytometrisk metode til optælling af hæmatopoietiske progenitor- og stemceller i perifert blod, leukofere-seprodukter, knoglemarv og navlesnorsblod.

REAGENSINDHOLD

Stem-Kit-reagenser indeholder følgende:

- CD45-FITC / CD34-PE reagens (45/34) – 1 hætteglas.
- CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagens (45/CTRL) – 1 hætteglas.
- Stem-Count-fluorosfærer – 1 hætteglas.
- 7-AAD levedygtighedsfarvestof – 1 hætteglas.
- 10X NH₄Cl lyseringsopløsning – 2 hætteglas.

1. Disse reagenser skal anvendes som leveret i et sæt.

Flow-Count-fluorosfærer, som svarer til Stem-Count-fluorosfærer, kan bruges til at bestemme absolut tælling, hvis der anvendes den specifikke analyserede koncentration.

2. CD45-FITC / CD34-PE er et brugsklart, tofarvet reagens, der leveres i 2,2 mL fosfatbufferet saltopløsning (PBS) med 2 mg/mL okse-serumalbumin (BSA) og 0,1 % natriumazid som konserveringsmiddel.
3. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE er et brugsklart, tofarvet reagens, der leveres i 1,2 mL PBS med 2 mg/mL BSA og 0,1 % natriumazid som konserveringsmiddel. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagenset er en blanding af ukonjugeret og PE-konjugeret (CD34 identisk), 581 monoklonalt, antistof. Denne blanding fungerer som en relevant, isomorfologisk kontrol for at kontrollere den ikke-specifikke binding af CD34-PE mAb på hver eneste prøve.

BEMÆRK: CD45-FITC / CD34-PE og CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagenserne må ikke separeres. Når prøverne og kontrollerne udføres, skal man sikre sig, at begge reagenser har samme partinummer på hætteglasetiketten.

Oversigt over antistoffers karakteristika

Specificitet	CD45	CD34
Klon	J33	581
Hybridom	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig kæde	IgG1, κ lyskæder	IgG1, κ lyskæder
Arter	Mus	Mus
Konjugation	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	R-phycoerythrin (PE)
Molarforhold	5-8 mol FITC / mol Ig	0,5-1,5 mol PE/mol Ig
Excitationsbølglængde	488 nM (blå-grøn)	488 nM (blå-grøn)
Fluorescensemission	504 til 541 nm (hovedsageligt grøn)	568 til 590 nm (hovedsageligt orange)

4. Stem-Count-fluorofærene eller Flow-Count-fluorofærene består af 10 µm (nominel diameter) fluorescerende mikrosfærer af polystyren i et 20 mL vandigt opløsningsmedie, der indeholder en tensid og 1 % formaldehyd. De enkelte fluorofærer indeholder en farve, hvis emissionsområde for fluorescens er 525 nm til 700 nm ved excitation ved 488 nm. Den analyserede koncentration med Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer (fluorofærer/µL) udledes af flere replikatanalyser med en COULTER-størrelsesanalysator til partikler. Den partispecifikke værdi er angivet på hætteglassets etiket.
5. 7-AAD levedygtighedsfarvestoffet leveret i 99 % fosfatbufferet saltopløsning (PBS: 0,01 M natriumfosfat, 0,145 M natriumklorid, pH 7,2), med 1 % dimethylsulfoxid (DMSO).
6. NH₄Cl lyseringsopløsningen leveres som en 10X koncentreret, 20 mL opløsning. Den indeholder en blanding af ammoniumklorid (NH₄Cl), kaliumbikarbonat (KHCO₂), dinatrium-ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA).

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

1. Monoklonale antistofpræparater indeholder 0,1 % natriumazid. Under sure forhold afgiver natriumazid hydrogenazid, som er en ekstremt giftig forbindelse. Udledning i kloaksystemer skal ledsages af store mængder rindende vand for at undgå farlig akkumulering i metalprøverør og fare for eksplosioner.
2. Prøver og alt materiale, der kommer i kontakt med disse, skal håndteres som smittefarlige og bortskaffes under behørig hensyntagen til dette.
3. Pipettér aldrig med munden og undgå, at prøver og reagenser kommer i kontakt med hud og slimhinder.
4. Anvend ikke reagenser efter udløbsdatoen på hætteglassets etiket.
5. Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer indeholder 1 % formaldehyd. Undgå kontakt med hud og øjne, da formaldehyd kan give varige skader på denne form for væv. Undgå indånding af dampe. Anvend egnet sikkerhedsudstyr, f.eks. handsker og sikkerhedsbriller.
6. Udsæt ikke Stem-Kit-reagenser for stærkt lys eller varme under opbevaring og brug.
7. Undgå fordampning og udsivning af Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, da der ellers kan opstå fejlagtige resultater. Sæt hættene godt i hætteglassene efter brug, og opbevar dem opretstående.
8. Sørg for, at fluorofærerne er fuldstændigt opslemmet inden brug. Undgå overdreven blanding for at minimere dannelsen af luftbobler. Luftbobler må ikke pipetteres, idet det kan føre til fejlagtige resultater.
9. Brug en kalibreret pipette (positiv overførsels- eller gentagelsespipetter foretrækkes) til udlevering af prøver og Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, da der ellers kan opstå fejlagtige resultater.
10. Brug de pipetteringsteknikker, der anbefales af pipetteproducenten for at sikre nøjagtig og præcis pipettering af prøverne og Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, idet der ellers kan forekomme fejlagtige resultater.
11. Farvede og lyserede prøver, skal opbevares på is og analyseres på flowcytometeret i overensstemmelse med oplysningerne i afsnittet "Stabilitet af behandlet prøve", da der ellers kan opstå fejlagtige resultater.
12. Sørg for, at mindst 1000 Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer tælles, idet den automatiske konvertering af resultaterne til absolutte tællinger ikke vil finde sted.
13. Alle partier af Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer har en helt specifik koncentration af fluorofærer. Sørg for, at den analyserede koncentration anvendes til fastlæggelse af resultater af absolut tælling.
14. Forberedelsesmetoder, der har et trin med obligatorisk vask, bør ikke anvendes pga. et ukendt tab af celler.
15. Brugen af andre inkubations- og blandingstider eller -temperaturer end de angivne kan føre til fejlagtige resultater.
16. 7-AAD levedygtighedsfarvestof indeholder 0,005 % 7-AAD. Ren 7-AAD er et potentielt carcinogen. Selvom denne forbindelse er stærkt fortyndet, anbefaler vi at undgå kontakt med hud og øjne, at bære egnet beskyttelsestøj og -handsker samt hensigtsmæssig øjen-/ansigtssvævn.
17. 7-AAD levedygtighedsfarvestof indeholder 1 % dimethylsulfoxid (DMSO). Ren DMSO irriterer huden. Selvom denne forbindelse er fortyndet, anbefaler vi at undgå kontakt med hud og øjne, at bære egnet beskyttelsestøj og -handsker samt hensigtsmæssig øjen-/ansigtssvævn.
18. Som kromofor tåler 7-AAD ikke lys. Opbevar 7-AAD levedygtighedsfarvestoffet i sættets papemballage for at undgå kontinuerlig udsættelse for lys under opbevaring.
19. Minimér blandede prøvers udsættelse for lys under inkubation.
20. Anvend almindelig god laboratoriepraksis under håndtering af reagenser.

GHS FAREKLASSIFIKATION

Stem-Count fluorofærer

FARE





H316
H317
H350
P201
P280

Forårsager mild hudirritation.
Kan forårsage allergisk hudreaktion.
Kan fremkalde kræft.
Indhent særlige anvisninger før brug.
Bær beskyttelseshandsker,
beskyttelsestøj og
øjen-/ansigtsbeskyttelse.
VED eksponering eller mistanke om
eksponering: Søg lægehjælp.
Ved hudirritation eller udslet: Søg
lægehjælp.
Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes
inden anvendelse.
Formaldehyd 0,5 - 1,0%
en blanding af:
5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on
[EF nr. 247-500-7] og
2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EF nr.
220-239-6] (3:1) < 0,05%

7-AAD levedygtighedsfarvestof ADVARSEL
H316
P332+P313

Forårsager mild hudirritation.
Ved hudirritation: Søg lægehjælp.
Dimethylsulfoxid 0,5 - 2%



Sikkerhedsdatablad findes på beckman.com/techdocs

OPBEVARINGSBETINGELSER OG HOLDBARHED

Det uåbnede reagens er stabilt, indtil udløbsdatoen, der er angivet på hætteglasset, når det opbevares ved 2-8 °C i mørke. Må ikke bruges efter udløbsdatoen. Må ikke nedfryses. Stem-Kit-reagenset er stabilt i 30 dage efter åbning af hætteglas med Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer. Åbnede hætteglas skal påsættes hætte straks efter brug og opbevares ved 2-8 °C i mørke. Stem-Count-fluorofærer og Flow-Count-fluorofærer må IKKE alikvoteres fra deres oprindelige hætteglas.

VIGTIGT: Risiko for fejlagtige resultater, hvis der opstår udsivning af Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer. Når flasken med Flow-Count-fluorofærer er blevet åbnet, skal den opbevares opretstående for at forhindre evt. udsivning. Reagenser må ikke benyttes, hvis der er tegn på udsivning.

Tegn på Forringelse

Tegn på forringelse kan opstå i følgende situationer:

Stem-Kit-reagenser, undtaget Stem-Count-fluorofærer

- En ændring i normal udseende anføres nedenfor

Reagens	Normalt udseende
CD45-FITC / CD34-PE	Klar, lettere pink væske
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Klar til lettere pink væske
7-AAD levedygtighedsfarvestof	Klar, lettere pink til rødlig væske
NH ₄ CL lyseringsopløsning	Klar, farveløs væske

Stem-Count Fluorospheres

- Udseendet - under indhentning - af sekundære fluorescerende populationer, der indeholder mere end 20 % af den samlede population af fluorofærer.
- En større variation i værdierne, der blev indhentet for tællinger eller prøver.

VIGTIGT: Reagenser bør ikke anvendes, hvis der er tegn på forringelse, idet der blev opnået ukorrekte resultater. Ring til den lokale Beckman Coulter-repræsentant, hvis der er tegn på forringelse.

Reagensforberedelse

1. De tofarvede CD45-FITC / CD34-PE og CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagenser anvendes direkte fra hætteglasset uden fortynding.
2. Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer anvendes direkte fra hætteglasset uden fortynding. Alt aluminiummet fra varmemeforseglingen skal fjernes fra flaskehalsen, når den åbnes første gang. Ordentlig blanding er nødvendig. Når hætteglasset med Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer håndteres først på dagen, vortex i 3-5 sekunder.

Før pipettering fra hætteglasset, omryst forsigtigt med 3-5 hætteglasinversioner.

Efter indledende vortex ved dagens begyndelse sættes fluorofærehætteglassene tilbage til 2-8 °C, indtil de skal bruges.

Undgå fordampning og udsivning at sætte hæften godt fast på hætteglasset efter brug.

3. 7-AAD levedygtighedsfarvestof anvendes direkte fra hætteglasset uden fortynding.
4. En 1X NH₄Cl lyseringsopløsning skal klargøres daglig: Tilsæt ni kvanta deioniseret vand til et kvantum 10X koncentreret NH₄Cl lyseringsopløsning. Må ikke nedkøles. Kasser den ubrugte 1X NH₄Cl lyseringsopløsning ved dagens afslutning.

Bring alle reagenser til stuetemperatur (18-25 °C) før brug.

HÅNDTERING AF PRØVE

Præparatkrav

Prøvehåndteringsresumé:

Præparattype	Gating-metode	Opbevaringstemperatur	Prøvens alder
Aferese	Algoritme	2-8 °C	24 timer
	Manuel	2-8 °C	24 timer
Knoglemarv	Algoritme	2-8 °C	24 timer
	Manuel	2-8 °C	24 timer
Navlesnorsblod	Algoritme	18-25 °C	24 timer
	Manuel	18-25 °C	24 timer
Normalt fuldblod	Algoritme	18-25 °C	20 timer
	Manuel	18-25 °C	20 timer
Mobiliseret fuldblod	Algoritme	18-25 °C	20 timer
	Manuel	18-25 °C	20 timer

1. Biologiske præparater omfatter frisk, normalt eller mobiliseret, perifer fuldblod og friske eller optøede afereseprodukter, navlesnorsblod og knoglemarv.
2. Manipulerede eller rensede hæmatopoietiske progenitorceller (HPC) kan kun analyseres med den manuelle gating-metode.
3. Indsaml afereseprodukter, perifere blodpræparater, navlesnorspræparater eller knoglemarvspræparater aseptisk i et sterilt, udtømt blodopsamlingsrør med ACD-formel A eller K3-EDTA-antikoagulant.
4. Fuldblod og mobiliserede fuldblodspræparater opsamlet i blodopsamlingsrør med antikoagulant kan opbevares i op til 20 timer ved stuetemperatur (18-25 °C), før der opstår farvning.
5. Navlesnorspræparater opsamlet i blodopsamlingsrør med antikoagulant kan opbevares i op til 24 timer ved stuetemperatur (18-25 °C), før der opstår farvning.
6. Opsamlede afereseprodukter og knoglemarvsprøver kan opbevares i op til 24 timer ved 2-8 °C, før der opstår farvning.
7. Før klargøring af prøver, skal det sikres, at koncentrationen af hvide blodceller (HBC) ikke er større end 30 x 10⁹ HBC-celler/L. Om nødvendigt fortyndes prøven med HBSS eller tilsvarende for at nå en gennemsnitsværdi på 15 x 10⁹ HBC-celler/L. Notér fortyndingsfaktoren til beregning af den endelige HPC absolut tælling.
8. Lave proteinkoncentrationer kan medføre sammenklumpning af Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer og give fejlagtigt høje absolutte celletællinger. Fortynding af præparater med en lav proteinkoncentration skal udføres ved brug af en proteinberiget buffer.
9. Alle præparater bør behandles med Stem-Kit-reagenser, inklusive 7-AAD levedygtighedsfarvestof.

Procedure for præparatbehandling

Udfør tests in duplo ved at følge "ISHAGE-retningslinjerne for CD34+ cellefastlæggelse med flowcytometri" (1).

BEMÆRK: Til Stem-Trol-kontrolcellebehandling henvises til indlægssedlen for Stem-Trol-kontrolceller vedr. fyldestgørende anvisninger, hvis den manuelle metode anvendes. Se stemONE System Guide (stemONE-systemvejledningen), der følger med stemONE-systemsoftwaren eller stemCXP System Guide (stemCXP-systemvejledningen), der følger med stemCXP-systemsoftwaren for fulde anvisninger, hvis den automatiserede metode anvendes.

1. Til hver præparatprøve etiketteres tre prøverør således:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipetter 20 µL CD45-FITC / CD34-PE-reagens i prøverørene: 45/34/7-AAD nr. 1 og 45/34/7-AAD nr. 2.
3. Pipetter 20 µL af CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagens i prøverøret: 45/CTRL/7-AAD.
4. Pipetter 20 µL 7-AAD levedygtighedsfarvestof i alle prøverør.

VIGTIGT: Der er risiko for mangelfuld lysering, hvis blodpræparatet forbliver øverst i eller på siden af prøverøret. Vær forsigtig ved pipettering for at undgå, at blodet kommer i kontakt med prøverørets top eller side. Rengør prøverør med en vatpind, hvis det er nødvendigt, for at fjerne alle spor af blodpræparatet fra prøverørets top eller side.

5. Brug en positiv overførselspipette eller gentagelsespipette til at pipettere 100 µL af patientprøven i prøverøret.
6. Vortex straks røret i 5 sekunder.
7. Inkuber alle prøverør i mørke ved stuetemperatur (18-25 °C) i 20 minutter.
8. Efter inkubation tilsæt 2 mL klargjort 1X NH₄Cl lyseringsopløsning i prøverøret, og vortex med det samme i 5 sekunder.

BEMÆRK: Oplysninger om klargøring af lyseringsopløsning findes i afsnit 7.2 ovenfor, kaldet KLARGØRING AF REAGENS.

VIGTIGT: Der er risiko for fejlagtige resultater, hvis der pipetteres luftbobler. Overdreven blanding af Stem-Count-fluorøsferer eller Flow-Count-fluorøsferer kan danne luftbobler. Undlad at blande Stem-Count-fluorøsferer eller Flow-Count-fluorøsferer for meget, og undlad at pipettere luftbobler ned i prøverørene.

9. Inkuber i mørke ved stuetemperatur i 10 minutter.
10. Bland forsigtigt Stem-Count-fluorøsferer Flow-Count-fluorøsferer ved at vende hætteglasset 3 til 5 gange før brug.
11. Før indhentning og umiddelbart efter trin 9 bruges en positiv overførsels- eller gentagelsespipette til at pipettere 100 µL Stem-Count-fluorøsferer eller Flow-Count-fluorøsferer i hvert af de tre prøverør.
12. Vortex hvert prøverør med det samme i 5 sekunder.

BEMÆRK: Oplysninger om klargøring af lyseringsopløsning findes i afsnit 7.2 ovenfor, kaldet KLARGØRING AF REAGENS.

Resumé over præparatfarvning

Reagenser/prøver	45/34/7-AAD #1	Prøverørsetiket 45/34/7-AAD nr. 2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD levedygtighedsfarvestof	20 µL	20 µL	20 µL
Prøve	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex – Inkuber ved stuetemperatur i 20 minutter. Beskyt mod lys.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vortex – Inkuber ved stuetemperatur i 10 minutter. Beskyt mod lys.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Omryst med vortex-mixer			
Opsamlede afereseprodukter, navlesnorsprøver og knoglemarvsprøver må ikke opbevares mere 60 minutter på is, før de indhentes.			

Reagenser/prøver	45/34/7-AAD #1	Prøverørsetiket 45/34/7-AAD nr. 2	45/CTRL/7-AAD
Fuldblods- og mobiliserede fuldblodsprøver må ikke opbevares mere end 45 minutter på is, før de indhentes.			
Analysér den optøede prøve med det samme.			
Beskyt mod lys			

Stabilitet af behandlet prøve:

- Opsamlede afereseprodukter, navlesnorsprøver og knoglemarvsprøver må ikke opbevares mere end 60 minutter på is efter tilføjelse af Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, før de indhentes.
- Fuldblods- og mobiliserede fuldblodsprøver må ikke opbevares mere end 45 minutter på is efter tilføjelse af Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, før de indhentes.
- Prøvetagning af frosne prøver bør foregå umiddelbart efter tilføjelse af Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer.
- Forarbejdede prøver skal opbevares på is og beskyttes mod lys, og eksponering for stuetemperatur skal så vidt mulig begrænses under prøvetagningen.

INDHOLD

Natriumazid kan danne eksplosive forbindelser i drænledninger af metal. Se NIOSH-bulletin: Explosive Azide Hazard (16.8.76) (Fare for eksplosiv azid).

For at undgå en eventuel akkumulering af azidforbindelser, skylles afløbsrør med vand efter bortskaffelse af ufortyndet reagens. Natriumazid skal bortskaffes i overensstemmelse med relevante lokale forskrifter.

PÅKRÆVEDE MATERIALER, SOM IKKE LEVERES MED SÆT:

- Deioniseret vand.
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) eller tilsvarende
- Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
- Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
- Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
- CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
- QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
- Som alternativ til Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
- Iskoldt bad
- Plastikprøverør (12 x 75 mm)
- Kalibreret gentagelsespipette (20 µL, 100 µL, 2 mL) med spidser eller kalibreret positiv overførselspipette (20 µL, 100 µL, 2 mL) med spidser
- Kalibreret standardpipette (20 µL, 100 µL, 2 mL) og spidser.
- Vortexmixer.
- Ur.
- Flowcytometer.
- stemCXP 2.0 softwarekit, stemCXP version 2.0, WIN 7, KUN til automatisk analyse af prøver på FC500 flowcytometersystem udstyret med CXP Software (Version 2.0).

RESULTATER

Indstilling af analyseprotokol

Flowcytometeret skal være udstyret til at detektere forlæns spredning, sidelæns spredning og fire fluorescenskanaler. For FL3-kanalen (til fluorescensovervågning på Stem-Count Fluorospheres eller Flow-Count Fluorospheres) skal der benyttes et pasfilter med en bånd på 620 nm. Til FL4-kanalen (til overvågning af 7-AAD Viability Dye) skal der benyttes et pasfilter med en længde på 675 nm.

Sørg for, at flowcytometeret er korrekt justeret og standardiseret til fluorescensintensitet.

Sørg for, at flowcytometeret er korrekt justeret til fluorescenskompensation.

BEMÆRK: Til præparatanalyser er alle regionspositioner omtrentlige, indtil 45/34/7-AAD nr. 1-prøverøret er indhentet. Regioner optimeres i henhold til følgende protokol, og justeres så IKKE til det anden og tredje prøverør i panelet.

En serie på 8 histogrammer og gating-planer skal følges ved præparatanalyser (se nedenfor). Den samme serie på 8 histogrammer og gating-planer skal følges, når der anvendes CD34+ kontrolceller. Region A, B, C og D (se afsnittet "Oprettelse af region" for definition af region) skal tilpasses for at inkludere karakteristiske klynger af CD34+ kontrolceller.

Oprettelse af histogram

Opret histogrammer på følgende måde:

1. Opret histogram 1 som FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter (sidelæns spredning).
2. Opret histogram 2 som FL2 CD34-PE vs. Side Scatter (sidelæns spredning).
3. Opret histogram 3 som FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter (sidelæns spredning).
4. Opret histogram 4 som Forward Scatter (forlæns spredning) vs. Side Scatter (sidelæns spredning).
5. Opret histogram 5 som FL1 CD45-FITC vs. FL2 CD34-PE.
6. Opret histogram 6 som Forward Scatter (forlæns spredning) vs. Side Scatter (sidelæns spredning).
7. Opret histogram 7 som tid vs. FL3 Stem-Count-fluorofæres eller Flow-Count-fluorofæres.
8. Opret histogram 8 som FL4 7-AAD levedygtighedsfarvestof vs. Side Scatter (sidelæns spredning).

Histogram 1 til 4 er beregnet til at karakterisere CD34+ HPC, en proces, der kan udskydes til analysetrinnet. Disse første fire histogrammer er indstillet i henhold til ISHAGE-retningslinjerne for CD34+-cellefastlæggelse med flowcytometri (1, 2). Histogram 5 og 7 er beregnet til at overvåge parametre, der er vigtige for det næste trin. Disse omfatter diskriminator til forlæns spredning, antallet af CD45+ hændelser, der skal indsamles, og korrekt akkumulering af enkelte fluorofæres.

Histogram 8 er beregnet til at diskriminere og analysere brugbare hændelser fra ikke-brugbare hændelser.

Oprettelse af region

Opret regioner på følgende måde:

1. Histogram 1 – Opret en retlinjet region A på histogram 1 for at medtage alle CD45+ leukocytter, og fjern blodplader, debris fra røde blodceller og aggregater.
2. Histogram 1 – Opret en amorf region E på histogram 1 til at omfatte lymfocytterne (lys CD45, lav sidelæns spredning).
3. Histogram 2 – Opret en retlinjet region B på histogram 2 for at medtage alle samlede CD34+ hændelser. Indstil tællingen til at stoppe ved 75 000 hændelser (CD45+ hændelser) for histogram 2.
4. Histogram 3 – Opret en amorphous (amorf) region C på histogram 3 for at medtage alle samlede CD45dim-hændelser.
5. Histogram 4 – Opret en amorphous (amorf) region D på histogram 4 for at medtage alle samlede hændelser med medium side scatter (sidelæns spredning) og medium til høj forward scatter (forlæns spredning).
6. Histogram 5 – Opret et quadstat område I på histogram 5 for at verificere den nedre grænse for CD45-udtrykket på CD34+-hændelser.
7. Histogram 5 – Opret en amorphous (amorf) region H på histogram 5 for at omkrænse alle Stem-Count eller Flow-Count Fluorospheres, inklusive dubletter. Region H bør være placeret i øverste højre hjørne af histogram 5.

BEMÆRK: Sørg for, at region H tegnes som en AMORPHOUS (amorf) region.

8. Histogram 5 – Opret retlinjet region K (kaldet "listgate –") på histogram 5. Fastsæt region K-grænser ved de to parameterhistogrammers første logdekade. Denne region K giver mulighed for at eliminere dobbelt negative hændelser under indhentningen for at analysere 75 000 relevante CD45+ hændelser.
9. Histogram 6 – Kopiér region D fra histogram 4 som region F i histogram 6.
10. Histogram 7 – Opret en retlinjet region G på histogram 7 for kun at medtage de enkelte Stem-Count-fluorofæres eller Flow-Count-fluorofæres. Region G kan etiketteres som "CAL" for at tillade automatisk beregning af absolutte tal for CD34+ HPC (se vejledningen til instrumentet for yderligere oplysninger).
11. Histogram 8 – Opret en retlinjet region J på histogram 8, der omfatter brugbare leukocytter (7-AAD levedygtighedsfarvestof negative hændelser).

Oprettelse af gate

Opret gates på følgende måde:

1. Histogram 1 – Giv histogram 1 bogstavet "J" for at vise alle brugbare hændelser. Hvis 7-AAD ikke bruges, gives "-H"-region til histogram 1 for at vise alle hændelser undtaget alle Stem-Count-fluorofæres eller Flow-Count-fluorofæres inklusive dubletter.
2. Histogram 2 – Giv histogram 2 bogstaverne "AJ" ("A", hvis 7-AAD ikke anvendes) for at vise alle brugbare (totalen, hvis 7-AAD ikke anvendes) CD34+ hændelser.
3. Histogram 3 – Giv bogstaverne "A" og "B" og "J" ("A" og "B", hvis 7-AAD ikke anvendes) til histogram 3 for at vise alle brugbare (totalen, hvis 7-AAD ikke anvendes) CD45+ / CD34+ hændelser.
4. Histogram 4 – Giv bogstaverne "A" og "B" og "C" og "J" ("A" og "B" og "C", hvis 7-AAD ikke anvendes) til histogram 4 for at vise brugbare (totalen, hvis 7-AAD ikke anvendes) CD45+ / CD34+ klyngehændelser med lav sidelæns spredning, mens blodplader og debris udelukkes. Hændelser fra område ABCDJ er faktiske, brugbare CD34+ HPC.
5. Histogram 5 – Ungated for at vise alle hændelser.
6. Histogram 6 – Giv bogstaverne "EJ" ("E" hvis 7-AAD ikke anvendes) til histogram 6 for at vise brugbare (totalen, hvis 7-AAD ikke anvendes) lymfocytter som en visuel kontrol på diskriminatoren.
7. Histogram 7 – Giv histogram 7 bogstavet "H" for at vise alle Stem-Count-fluorofæres eller Flow-Count-fluorofæres, inklusive dubletter.
8. Histogram 8 – Giv histogram 8 bogstavet "A" for at vise CD45+ hændelser.

Indstilling af flowcytometri

1. Bekræft, at flowcytometeret er korrekt justeret og optimeret til let spredning og fluorescensintensiteter i FL1-, FL2-, FL3- og FL4-detektorer i henhold til producentens og laboratoriets retningslinjer. Bekræft, at farvekompensationen er indstillet til standardoperation. Se instrumentets vejledning for yderligere instruktioner.
2. Vortex-prøverør i 5 sekunder.
3. Udfør datahentning på flowcytometeret. Der skal analyseres mindst 75 000 CD45+-hændelser.
4. Til præparatanalyse: Justér diskriminatoren og regionerne ved at analysere prøverør 45/34/7-AAD nr. 1. Gem protokollen, og analysér 45/34/7-AAD nr. 2 og 45/CTRL/7-AAD-prøverørene uden yderligere justering.

Analyseeksempel

De histogrammer, der vises i TILLÆGGET, er vist i stigende rækkefølge som vist på protokollen.

Beregning af CD34+ HPC til præparat

Antallet af CD34+ HPC beregnes som gennemsnittet af region D statistiske resultater for de to replikatprøver (dvs. 45/34/7-AAD nr. 1 og 45/34/7-AAD nr. 2).

CD34+ HPC-resultaterne anses for at være gyldige, hvis resultaterne, der opnås med CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagenset, er mindre end 10 % af CD34+ HPC-resultaterne.

1. Beregn gennemsnittet af resultaterne indhentet fra prøverør med 45/34/7-AAD nr. 1 og 45/34/7-AAD nr. 2 for hvert præparat (dvs. gennemsnittet af region D statistikudskriftsresultater). Antallet af CD34+ HPC falder muligvis inden for 10 % af gennemsnittet for duplikatprøverne. Værdien, der opnås med 45/CTRL/7-AAD-kontrolprøverøret, skal repræsentere mindre end 10 % af den gennemsnitlige værdi opnået fra prøverørene for at kunne validere resultaterne

NOTER: Hvis gennemsnittet for den absolutte tælling, der opnås for duplikatet CD34+ HPC, falder uden for det accepterede område (dvs. overskrider 10 %), skal det bestemmes, om pipettering er korrekt udført, især for Stem-Count-fluorofærene eller Flow-Count-fluorofærene. Kontrollér visuelt flowcytometerrapporterne og kvaliteten af farvnings- og lyseringsprocessen i prøverørene. Kontrollér, hvordan regionens grænser blev indstillet.

Hvis den opnåede værdi med 45/CTRL/7-AAD falder uden for området af accepterede værdier (dvs. overskrider 10 % af gennemsnittet af absolut tælling for duplikatet), fastlægges det, om pipetteringen blev korrekt udført, især for Stem-Count-fluorofæres eller Flow-Count-fluorofæres. Kontrollér visuelt flowcytometerrapporterne og kvaliteten af farvnings- og lyseringsprocessen i prøverørene. Kontrollér, hvordan regionens grænser blev indstillet.

Om nødvendigt gentages indhentningstrinnet med tilføjelse af et BLINDRØR efter første duplikatrør 45/34/7-AAD nr. 1 og nr. 2 samt før 45/CTRL/7-AAD-prøverøret. Om nødvendigt gentages hele klargøringen med nye prøverør og tilføjelse af BLINDRØRET. Indhent, og analysér både de nye og de tidligere serier af prøverør. Sammenlign de to resultater. Hvis der ikke er nogen overensstemmelse, skal du ringe til Beckman Coulter-repræsentanten.

2. Hvis prøven er blevet fortyndet, SKAL resultatet, der blev opnået ovenfor, multipliceres med fortyndingsfaktoren (fortynd.) Det endelige resultat, der opnås, er den absolutte CD34+ HPC tælling (celler/ μ L).

$$\text{CD34+ HPC absolut tælling (celler/}\mu\text{L)} = \text{CD34+ HPC udskriftsresultat for absolut tælling (celler/}\mu\text{L)} \times \text{fortynd}$$

3. For aferesepakker kan det samlede antal CD34+ HPC pr. pakke beregnes med følgende formel:

$$\text{CD34+ HPC totalt antal pr. pakke} = \text{CD34+ HPC absolut tælling (celler/}\mu\text{L)} \times 10^6 \times \text{pakkevolumen (L)}$$

Hvor:

4. Se formelen nedenfor for procentdele CD34+ HPC i CD45+ leukocytværdiberegningen:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{CD34+ HPC absolut tælling (celler/}\mu\text{L)} \text{ (dvs. region D udskriftsresultater)}}{\text{CD45+ leukocyt absolut tælling (celler/}\mu\text{L)} \text{ (dvs. region A udskriftsresultater)}} \times 100$$

KVALITETSKONTROL

Sørg for, at flowcytometeret er korrekt justeret i henhold til producentens anbefalinger som anført i vejledningerne til instrumentet. Målintensiteter er blevet fastlagt for at optimere lysspredning og indstillinger for fluorescensinstrument til analyse af prøver farvet med CD45-FITC / CD34-PE-monoklonalt antistofreagens og CD45-FITC / Isoclonic Control-PE-reagens.

Fluorokromernes fluorescein-isothiocyanat (FITC), fykoerythrin (PE) og 7-Amino Actinomycin D farvestof (7-AAD) udsender på forskellige bølgelængder, men de har dog nogen spektral overlapning, som skal korrigeres med elektronisk kompensation. Optimale kompensationsniveauer kan etableres ved, i et dobbeltparameterhistogram, at analysere en fuldblodsprøve tilsat Stem-Trol Control Cells farvet med 7-AAD levedygtighedsfarvestof og hensigtsmæssige kompensationsreagenser, når der bruges CXP-software. I denne analyse foretages justeringer for at sikre, at der ikke opstår farvning i den tofarvede kvadrant med de enkelte fluorokromer.

7-AAD levedygtighedsfarvestof (7-Amino Actinomycin D) anvendes til at identificere ikke-brugbare celler med flowcytometrisk analyse for at muliggøre optælling af brugbare celler af interesse. Farvestoffet optages af døde celler (lyse hændelser), der så undtages brugbare celler (negative hændelser) ved gating (se histogram 8).

Før analysering af prøver bør en analyseret kontrol (Stem-Trol-kontrolceller) farves for at verificere antistofreaktivitet.

YDEEVNE

De opgivne ydelseskarakteristika er baseret på Stem-Kit-reagenser anvendt med et COULTER EPICS XL/XL-MCL-flowcytometer med System II-software. For eksempler på ydelse på en FC 500 med CXP-software se stemCXP System Guide (stemCXP-systemvejledningen).

Forventede værdier for referenceområder

Normale fuldblodspræparater (n = 117) blev indsamlet fra en population af mænd (n = 58) og kvinder (n = 59) for at fastlægge et normalt referenceområde. Dette forsøg udføres på et eksternt evalueringssted. Replikatprøver til hvert præparat blev klargjort i henhold til indlægssedlen til Stem-Kit-reagenser. Manuel gating og analyse blev udført for at opnå CD45+, CD34+ og CD34 %-værdier.

Den statistiske analyse tyder på en ikke-Gaussian fordeling af de indsamlede data. Baseret på disse resultater blev der anvendt en ikke-parametrisk (robust) tilgang til at analysere dataene. CD45+, CD34+, and CD34 %-værdier blev opnået. Værdier udtrykkes som absolutte tællinger (celler/μL) for CD45+ og CD34+ samt procent af den samlede leukocytælling (CD34 %) som vist i tabellen nedenfor.

Rask fuldblod: Referenceområder

Manuel metode (robust analyse)	n	CD45+ (celler/μL)				CD34+ (celler/μL)				CD34+ (%)			
		Min.	Maks.	Gennemsnit	SD	Min.	Maks.	Gennemsnit	SD	Min.	Maks.	Gennemsnit	SD
Manuel	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Disse værdier er beregnet til kun at være repræsentative. Hvert laboratorium bør fastlægge deres egne forventede værdier fra den lokale population af raske donorer.

Linearitet

Replikatmålinger blev udført på hver eneste af 10 seriefortyndinger for 2 typer prøver: CD34+-tilsat fuldblod og frisk, mobiliseret perifert fuldblod. Et dynamisk interval på 0 til 2000 celler/μL og et lavt sensitivitetsinterval på 0 til 150 celler/μL blev opnået for CD34+ HPC-koncentrationer. Prøver blev klargjort i henhold til indlægssedlen til Stem-Kit-reagenser og analyseret på et COULTER EPICS XL/XL-MCL-flowcytometer. Værdier udtrykkes som absolutte tællinger (celler/μL). Resultater blev analyseret med hensyn til lineære regressionsanalyser for forventede versus restituerede, absolutte tællinger for gennemsnittet af replikater minus endogene CD34+ celler. Se tabellerne herunder.

Regressionslinjernes hældninger, der fulgte med plottene for de samlede CD34+ HPC absolutte tællinger, viste den matematiske måling af linearitet. Dette understøttes af minimal potentiel analyseskævhed som bevist af y-skæringspunkterne for analysen. Forventede absolutte tællinger viser høj korrelation med de restituerede absolutte tællinger.

Resultater for CD34+ tilsat fuldblod

Se tillægget med en graf.

Perifere (mobiliserede) blodresultater

Se tillægget med en graf.

Metodenøjagtighed (tabeller) (forventede vs. restituerede resultater)

Metodenøjagtighed defineres som graden af overensstemmelse mellem forventede og restituerede resultater for både manuelle og automatiserede gating- og analysemetoder. Frisk, normalt, perifert fuldblod tilsat rensede CD34+ celler til et niveau på 1875 celler/ μ L. Celletællinger blev bekræftet af et Malassez hæmacytometer med objektglas og serielt fortyndet til forskellige koncentrationer. Forventede resultater sammenlignes med restituerede resultater for gennemsnittet af duplikatmålinger ved brug af automatiseret og manuel gating og analyse for hvert fortyndingsniveau. Testning for hældning og ordinator i skæringspunktet viste ingen statistisk forskel mellem den automatiserede gating og analyse og de forventede resultater, og heller ikke mellem den manuelle gating og analyse og de forventede resultater.

Metodenøjagtighed - CD34+ (%)

Se tillægget med en graf.

Metodenøjagtighed - CD34+ absolut tælling (celler/ μ L)

Se tillægget med en graf.

Metodenøjagtighed - Leukocytter i alt - CD45+ (celler/ μ L)

Se tillægget med en graf.

Metodens nøjagtighed (automatiske vs. manuelle resultater)

Graden af nøjagtighed mellem de automatiserede og manuelle metoder i stemONE-systemet blev undersøgt på fire eksterne evalueringssteder med præparater af frisk, perifert fuldblod og frisk eller optøet aferese, navlesnorsblod og knoglemarv. Konfidensintervallerne (CI) blev beregnet med 95 % grænser.

Prøver af frisk perifert fuldblod (n = 59 fra tre steder), friske afereseprodukter (n = 51 fra tre steder), frisk navlesnorsblod (n = 29 fra to steder), frisk knoglemarv (n = 33 fra to steder), optøede afereseprodukter (n = 23 fra ét sted), optøet navlesnorsblod (n = 31 fra to steder) samt optøet knoglemarv (n = 20 fra ét sted) blev klargjort i henhold til indlægssedlen til Stem-Kit-reagenser og analyseret på COULTER EPICS XL/XL-MCL-flowcytometre. Automatiseret og manuel gating og analyse blev udført for at opnå CD45+, CD34+ og CD34 %-værdier.

Metodenøjagtighed (tal)

Præparater af frisk, perifert fuldblod (n = 59)

Se tillægget med en graf.

Friske aferesepræparater (n = 51)

Se tillægget med en graf.

Præparater af frisk navlesnorsblod (n = 29)

Se tillægget med en graf.

Præparater af frisk knoglemarv (n = 33)

Se tillægget med en graf.

Optøede aferesepræparater (n = 23)

Se tillægget med en graf.

Optøede præparater af navlesnorsblod (n = 31)

Se tillægget med en graf.

Optøede knoglemarvspræparater (n = 20)

Se tillægget med en graf.

Præcision

Interlaboratoriel nøjagtighed

Der blev gennemført undersøgelser i én klinisk facilitet af tre operatører, der hver især anvendte et andet flowcytometer. Tre præparater, der repræsenterer CD34+ dynamisk område (0-2000 celler/ μ L) blev identificeret:

Lavt område:	frisk, mobiliseret, perifert blod
Mellemområde:	afereseprodukt
Højt område:	afereseprodukt

Disse præparater blev delt i tre aliquots: én aliquot af hvert niveau (lav, middel, høj) blev givet til hver af de tre operatører. Prøver blev klargjort (n = 10) fra hver aliquot i henhold til indlægssedlen til Stem-Kit-reagenserne. Hver operatør foretog analysen på et EPICS XL-flowcytometer ved brug af automatiseret og manuel gating og analyse for at opnå CD45+, CD34+ og CD34 %-værdier. Værdier udtrykkes som procent (%) af den samlede leukocyttælling og som absolutte tællinger (celler/ μ L).

Resultaterne af studiet af interlaboratoriel nøjagtighed, findes i tabellen nedenfor. Værdierne, der blev opnået for CD45+ og CD34+ absolutte tællinger samt CD34-procenter, viste begrænset variation som bevist for replikatmålingerne af gennemsnit, standardafvigelser og variationskoefficienter.

Se tillægget med en graf.

Intralaboratoriel nøjagtighed

Præparater, der dækkede analysens dynamiske område, blev opnået ved anvendelse af frisk perifert fuldblod, frisk knoglemarv og frisk og optøet aferese og navlesnorsblod fra fire eksterne evalueringssteder. Ti prøver fra hver blev klargjort i henhold til indlægssedlen til Stem-Kit-reagenser og analyseret på COULTER EPICS XL/XL-MCL-flowcytometre ved brug af manuel gating og analyse for at opnå CD45+, CD34+ og CD34 %-værdier.

Værdierne for CD45+, CD34+, og CD34 % angivet i de næste tabeller viser, at analysemetoden kan reproducere som bevist med middelværdierne, standardafvigelserne og variationskoefficienterne for disse målinger. Datatabellerne vist i TILLÆG viser intralaboratoriel nøjagtighed for analysen.

Se tillægget med en graf.

BEGRÆNSNINGER

Se stemCXP System Guide (stemCXP-systemvejledningen), som følger med stemCXP-systemsoftwaren for begrænsninger, når den automatiske metode anvendes.

- Farvede og lyserede prøver, skal opbevares på is og analyseres på flowcytometeret i overensstemmelse med oplysningerne i afsnittet "Stabilitet af behandlet prøve", da der ellers kan opstå fejlagtige resultater.
- Fortynd, portionsopdel eller nedfrys ikke reagenserne. Anvend kun som pakket.
- Reagenserne er kun beregnet til brug i flowcytometri.
- Optø præparater fuldstændig for at sikre optimal farvning.
- Alle røde blodceller lyser muligvis ikke under følgende betingelser: tilstedeværelse af kerneholdige, røde blodceller, unormale proteinkoncentrationer eller hæmoglobinopati. Dette kan forårsage fejlagtigt faldende CD34 % resultater, fordi ulyserede røde blodceller tælles som leukocytter. CD34+ og CD45+ absolutte tællinger skulle ikke blive berørt.
- Nogle patienter kan udgøre særlige problemer som følge af ændrede eller meget lave tal for visse cellepopulationer.
- Resultater, der opnås med flowcytometri, kan være fejlagtige, hvis gates er forkert indstillet.
- Stem-Kit-reagenser er beregnet til at bruge 7-AAD levedygtighedsfarvestof til at bestemme HPC-brugbare celler. Hvis jeres laboratorium anvender en alternativ metode for fastlæggelse af brugbarhed, skal generel god laboratoriepraksis og laboratoriets kvalitetskontrolprocedurer følges for at sikre de rapporterede resultaters kvalitet.

VAREMÆRKER

Beckman Coulter, det stiliserede logo og de Beckman Coulter produkt- og servicemærker, der er omtalt heri, er varemærker eller registrerede varemærker tilhørende Beckman Coulter, Inc. i USA og andre lande.

YDERLIGERE OPLYSNINGER

www.beckmancoulter.com

Symbolnøgle

En ordliste over symboler findes på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

Stem-Kit reagenser

REF IM3630 50 tester

För *in vitro*-diagnostik

AVSEDD ANVÄNDNING

Stem-Kit-reagenser består av ett tvåfärgat fluorescent (FITC, PE) murint monoklonalt antikroppsreagens, en tvåfärgad murin fluorescent (FITC, PE) isoklonisk kontroll, ett reagens för absolut antal, ett reagens för cellviabilitet och ett lyseringsreagens. Det är avsett för *in vitro*-diagnostik för den samtidiga identifieringen samt procentantal och absolut antal av CD45+ och dubbelpositiva cellpopulationer av CD45+ CD34+ i biologiska prover med hjälp av flödescytometri. De biologiska proverna innehåller färskt normalt eller mobiliserat perifert helblod och färsk eller tinade aferesprodukter, navelsträngsblod och benmärg. Cellpopulationsmätning kan göras med hjälp av antingen en automatiserad metod eller en manuell metod för gating och analys.

Fullständiga anvisningar vid användning av den manuella metoden finns i denna packsedel för Stem-Kit-reagenserna. Se guiden för stemCXP-systemet som medföljer stemCXP 2.0-programvarusatsen och stemCXP version 2.0, WIN 7 för fullständiga anvisningar om du använder den automatiserade metoden.

SAMMANFATTNING

Hematopoietiska progenitorceller (HPC)

Stem-Kit-reagenser är utformade för att identifiera de humana hematopoietiska progenitorcellerna (HPC) med hjälp av följande kriterier: "Äkta CD34+-celler (a) uttrycker CD34-antigen, (b) uttrycker CD45-antigen med en färgningsintensitet som är karakteristisk för blastceller (dvs. lätt detekterbar men vid lägre nivåer än lymfocyter och monocytter) och (c) uppvisar ljusspridningskarakteristika från låg sidovinkel och låg till mellanhöj framåtvinkel för blastceller" (1). Uteslutning av döda CD34+ HPC från räkning av livskraftiga CD34+ HPC uppnås med hjälp av viabilitetsfärgämnet 7-AAD (2).

CD34

CD34-antigenet är en grupp med differentiellt glykosylerade typ I transmembrana glykoproteiner med en kedja (3, 4, 5). Det uttrycks på i stort sett alla hematopoietiska precursorceller inklusive multipotenta stamceller. CD34-epitoper har delats in i tre klasser baserat på känslighet för neuraminidas och för glykoproteas från *Pasteurella haemolytica* (6). CD34 monoklonal antikropp (mAb) som används i Stem-Kit-reagenser benämns 581. Den känner specifikt igen en epitop av klass III i CD34-molekylen (7) så som den definieras av enzymatiska klyvningsmönster (6, 8). Den monoklonala antikroppen 581 tilldelades CD34 under 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5:e HLDA-studiegruppen om differentieringsantigener på humana leukocyter) i Boston, Massachusetts, USA 1993 (7).

CD45

CD45-antikroppen igenkänner medlemmar i CD45-familjen med pan-leukocytantigener med molekyllvikter på 180, 190, 210 och 220 kD (9, 10, 11). Den är också känd som leukocytgemensamma antigenet (LCA). CD45-antigenet uttrycks på varje typ av hematopoietisk cell förutom mogna erytrocyter och deras omedelbara progenitorer (11, 12). Det har inte detekterats i differentierad icke-hematopoietisk vävnad (12, 13, 14, 15). CD45 mAb som används i Stem-Kit-reagenser är benämnt J33. Det tilldelades CD45 under 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3:e HLDA-studiegruppen om differentieringsantigener på humana leukocyter) i Oxford i England 1986 (16).

7-AAD

Viabilitetsfärgämnet 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) är en analog för actinomycin D som innehåller en ersatt aminogrupp vid position 7 i kromoforen. Viabilitetsfärgämnet 7-AAD interkaleras mellan cytosin- och guaninbaser i DNA:et (15). Actinomyciner är biologiskt aktiva föreningar som innehåller en 2-amino-4, 6 dimetyl-fenoxazin-3 kromofor och två cykliska pentapeptider (17). Actinomyciner bildar stabila komplex med dubbelsträngat deoxiribonukleinsyra (DNA), men varken med dubbelsträngad ribonukleinsyra (RNA) eller med RNA-DNA-hybrider eller med enkelsträngat DNA eller RNA (15, 18).

De spektrala egenskaperna hos viabilitetsfärgämnet 7-AAD gör denna molekyl särskilt lämplig för analys med flödescytometri (17). Maximal absorption av 7-AAD-/DNA-komplexet finns i den gröna spektrala regionen och är därför lämplig för en cytometer utrustad med argonlaser (exciteringsvåglängd 488 nm) (15). Den djupt röda fluorescensutstrålningen för viabilitetsfärgämnet 7-AAD (635 till 675 nm) gör användningen av denna sond lättare i kombination med fluoresceinisotiocyanat- (FITC) och fykoerytrin- (PE) konjugerade antikroppar eftersom, till skillnad mot propidiumiodid (PI), uppvisar 7-AAD-/DNA-komplexet minimal spektral överlappning med FITC och PE (17).

Apoptotiska, nekrotiska celler och/eller skadade celler är källor för interferens i analysen av livskraftiga celler genom flödescytometri. Icke-livskraftiga celler ska utvärderas och särskiljas genom att fokusera på 7-AAD-positiv färgning när livskraftiga celler förblir ofärgade (negativa) (19).

Flödescytometersystem

Flödescytometersystem (FC 500) tillämpar principerna om flödescytometri för att analysera biologiska prover i syfte att identifiera olika cellpopulationer som bestäms av de specifika monoklonala antikroppar och fluorokromer som används. Det aktuella testet använder FC 500 flödescytometersystem med CXP-systemprogramvara för att analysera prov.

PRINCIP

Detta test är beroende av förmågan hos en monoklonal antikropp att bindas till ytan på celler som uttrycker diskreta antigena determinanter. CD45-FITC/CD34-PE-reagenset i Stem-Kit-reagenser är en kombination av två murina monoklonala antikroppar, var och en konjugerad till en specifik fluorokrom och specifikt för en annan cellyteantigen. Specifik färgning av cellytor uppnås genom att inkubera dubbla prover av ett biologiskt prov med det tvåfärgade CD45-FITC-/CD34-PE-reagenset.

Ytterligare ett test med samma prov färgas med CD45-FITC-/IsoClonic Control-PE-reagens för att kontrollera den icke-specifika bindningen av den monoklonala antikroppen CD34-PE. Viabilitetsfärgämnet 7-AAD, ett nukleinsyrafärgämne som binds till tillgängliga baspar (cellulärt DNA) används för att skilja mellan livskraftiga och icke-livskraftiga celler. De röda blodkropparna i varje prov lyseras med NH₄Cl-lyseringslösning som bereds vid 1X. Stem-Count Fluorospheres eller Flow-Count Fluorospheres (reagenset för absoluta antal) tillsätts och de återstående cellerna analyseras med flödescytometri. Processkontroll och kvalitetskontroll för analysen ges av instrumentet och kvalitetskontrollreagenser för provet: Flow-Check Fluorospheres, Flow-Set Fluorospheres, lämpliga kompenseringsreagenser samt Stem-Trol Control Cells.

EXEMPEL PÅ KLINISKA TILLÄMPNINGAR

En kronologi över vetenskapliga rapporter om hematopoietiska celler (HPC) visar att tidiga studier förlitade sig på kärnförande cellräkningar för kvantifiering. Efterföljande studier som involverar analyser av kolonibildande enheter (CFU) gav grova uppskattningar av progenitorcellpopulationer. De tidsintensiva CFU-analyserna följdes av upptäckten av CD34-cellytemolekylen. CD34 befanns vara närvarande på ytan av tidiga hematopoietiska celler och hematopoietiska kolonibildande celler i benmärg och perifert blod (20). Monoklonala antikroppar riktade mot CD34-molekylen utvecklades sedan och användes i flödescytometri. CD34-bestämningar med flödescytometri accepteras nu allmänt som ett sätt att bedöma hematopoietiska progenitor- och stamceller.

I benmärgen hos normala individer kan 1 till 3 % av de celler som uttrycker CD34-antigenen rekonstituera långvarig hematopoies med flerlinje (3, 20). I perifert blod hos normala individer uttrycker mindre än 0,1 % av cirkulerande celler CD34-antigenet (1, 21). Användningen av Stem-Kit-reagenser ger en enkel, snabb och känslig flödescytometrisk metod för att räkna hematopoietiska progenitor- och stamceller i perifert blod, leukoferesprodukter, benmärg och navelsträngsblod.

REAGENSINNEHÅLL

Stem-Kit-reagenserna innehåller följande:

- CD45-FITC-/CD34-PE-reagens (45/34) – 1 flaska.
- CD45-FITC/IsoClonic Control-PE-reagens (45/CTRL) – 1 flaska.
- Stem-Count-fluorosfärer – 1 flaska.
- Viabilitetsfärgämnet 7-AAD – 1 flaska.
- 10X NH₄Cl-lyseringslösning – 2 flaskor.

1. Dessa reagenser måste användas som en uppsättning så som de levereras i satsen.

Flow-Count-fluorosfärer, som är likvärdiga Stem-Count-fluorosfärer, kan användas för bestämning av det absoluta antalet om den specifika analyserade koncentrationen används.

2. CD45-FITC/CD34-PE är ett tvåfärgsreagens färdigt att användas som tillhandahålls i 2,2 mL fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS) som innehåller 2 mg/mL bovint serumalbumin (BSA) och 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.
3. CD45-FITC-/IsoClonic Control-PE är ett tvåfärgsreagens färdigt att användas som tillhandahålls i 1,2 mL (PBS) och som innehåller 2 mg/mL BSA och 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel. CD45-FITC-/IsoClonic Control-PE-reagenset är en blandning av icke-konjugerad och PE-konjugerad (CD34-identisk) 581 monoklonal antikropp. Denna blandning fungerar som en lämplig isomorfologisk kontroll för att kontrollera den ospecifika bindningen av CD34-PE mAb på vart och ett av proverna.

OBS! CD45-FITC-/CD34-PE- och CD45-FITC-/IsoClonic Control-PE-reagenserna ska inte delas på. När testerna och kontrollerna utförs ska du vara noga med att båda reagenserna har samma lotnummer på flaskans etikett.

Sammanfattning av antikroppars egenskaper

Specificitet	CD45	CD34
Klon	J33	581
Hybridom	NS1 x balb/c	NSO x Balb/c
Immunogen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig-kedja	IgG1, κ-ljuskedjor	IgG1, κ-ljuskedjor
Arter	Mus	Mus
Konjugering	Fluoresceinisotiocyanat (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
Molförhållande	5–8 mol FITC/mol Ig	0,5–1,5 mol PE/mol Ig

Specificitet	CD45	CD34
Excitationsvåglängd	488 nM (blågrönt)	488 nM (blågrönt)
Utstrålning av fluorescens	504 till 541 nm (huvudsakligen grönt)	568 till 590 nm (huvudsakligen orange)

- Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror består av 10 µm (nominell diameter) fluorescanta mikrosfärer av polystyren i ett 20 mL vattenbaserat suspensionsmedel som innehåller ett surfaktant och 1 % formaldehyd. Varje fluorofär innehåller ett färgämne som har ett fluorescensemissionsintervall på 525 nm till 700 nm, vid excitation på 488 nm. Analyserad koncentration (fluorofärer/µL) för Stem-Count-fluorofärer eller Flow-Count-fluorofärer härleds från flera replikatanalyser med hjälp av en COULTER-partikelstorleksanalysator. Det lotspecifika värdet anges på flaskans etikett.
- Viabilitetsfärgämnet 7-AAD tillhandahålls i 99 % fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS: 0,01 M natriumfosfat, 0,145 M natriumklorid, pH 7,2) med 1 % dimetylsulfoxid (DMSO).
- NH₄Cl-lyseringslösningen tillhandahålls som en 10X koncentrerad lösning på 20 mL. Den innehåller en blandning av ammoniumklorid (NH₄Cl), kaliumbikarbonat (KHCO₃), dinatriumetylendiamintetraacetatsyra (EDTA).

VARNING OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- Monoklonala antikroppsberedningar innehåller 0,1 % natriumazid. Natriumazid avger under sura förhållanden hydrazinsyra, en ytterst giftig förening. Kassering i avloppssystem ska göras tillsammans med stora mängder rinnande vatten för att undvika farlig ansamling i metallrör och potentiella explosioner.
- Hantera alla prov och allt material som kommer i kontakt med dem som potentiella infektionsöverförare. Beakta tillämpliga försiktighetsåtgärder vid kasseringen.
- Pipettera aldrig med munnen och undvik att prover eller reagenser kommer i kontakt med hud och slemhinnor.
- Använd inte reagenser efter utgångsdatumet som anges på flaskans etikett.
- Stem-Count-fluorofärer eller Flow-Count-fluorofärer innehåller 1 % formaldehyd. Undvik kontakt med hud och ögon eftersom formaldehyd kan orsaka bestående skador på dessa vävnader. Andas inte in ångor. Bär lämplig skyddsutrustning såsom handskar och skyddsglasögon.
- Utsätt inte Stem-Kit-reagenser för starkt ljus eller stark värme vid förvaring eller användning.
- Undvik avdunstning och läckage av Stem-Count-fluorofärer eller Flow-Count-fluorofärer. Annars kan felaktiga resultat uppstå. Förslut flaskorna ordentligt efter användningen och förvara dem i upprätt läge.
- Se till att fluorofäerna är helt suspenderade före användning. Undvik överdriven blandning för att minimera bildande av luftbubblor. Pipettera inte luftbubblor. Det kan leda till felaktiga resultat.
- Använd en kalibrerad pipett (positiv förskjutnings- eller repeater-pipetter är att föredra) för dispensering av prover och Stem-Count-fluorofärer eller Flow-Count-fluorofärer. Annars kan resultaten bli felaktiga.
- Använd pipetteringstekniker som rekommenderas av pipettillverkaren för att säkerställa korrekt och exakt pipettering av prover och Stem-Count-fluorofärer eller Flow-Count-fluorofärer, annars kan felaktiga resultat uppkomma.
- Färgade och lyserade prover måste förvaras på is och analyseras på flödescytometern enligt informationen i avsnittet "Stabilitet för bearbetade prover", annars kan resultaten bli felaktiga.
- Säkerställ att minst 1 000 Stem-Count-fluorofärer eller Flow-Count-fluorofärer räknas. Annars utförs inte den automatiska konverteringen av resultat till absoluta antal.
- Varje lot Stem-Count-fluorofärer eller Flow-Count-fluorofärer har en specifik koncentration fluorofärer. Se till att korrekt analyserad koncentration används vid bestämning av resultat med absoluta antal.
- Beredningsmetoder som kräver ett tvättsteg bör inte användas på grund av okänd förlust av celler.
- Användningen av inkuberings- eller blandningstider eller andra temperaturer än de specificerade kan ge felaktiga resultat.
- Viabilitetsfärgämnet 7-AAD innehåller 0,005 % 7-AAD. Rent 7-AAD är potentiellt karcinogent. Även om denna sammansättning är starkt utspädd rekommenderar vi att undvika kontakt med hud och ögon, att använda lämpliga skyddskläder och -handskar samt ögon-/ansiktsskydd.
- Viabilitetsfärgämnet 7-AAD innehåller 1 % dimetylsulfoxid (DMSO). Ren DMSO är en irritant. Även om denna sammansättning är utspädd rekommenderar vi att undvika kontakt med hud och ögon, att använda lämpliga skyddskläder och -handskar samt ögon-/ansiktsskydd.
- 7-AAD är som kromofor känsligt för ljus. Förvara viabilitetsfärgämnet 7-AAD i satsens kartongförpackning för att undvika kontinuerlig exponering för ljus vid förvaring.
- Minimera exponering av blandade prover för ljus under inkubering.
- Använd allmän god laboratoriepraxis vid hantering av reagenser.

RISKKLASSIFICERING ENLIGT GHS

Stem-Count Fluorospheres

FARA



H316

Orsakar mild hudirritation.

H317

Kan orsaka allergisk hudreaktion.

H350

Kan ge cancer.

P201

Inhämta särskilda instruktioner före användning.

P280

Använd skyddshandskar, skyddskläder, ögonskydd/ansiktsskydd.

P308+P313

VID exponering eller misstanke om exponering: Sök läkarhjälp.

P333+P313

Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.

P362+P364

Ta av nedstänkta kläder och tvätta dem innan de används igen.

Formaldehyd 0,5 - 1,0 %

reaktionsblandning av:

5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on

[EG-nr 247-500-7] och

2-metyl-4-isotiazolin-3-on

[EG-nr 220-239-6] (3:1) < 0,05

%

7-AAD Viability Dye

VARNING

H316

Orsakar mild hudirritation.

P332+P313

Vid hudirritation: Sök läkarhjälp.

Dimetylsulfoxid 0,5 - 2 %



Safety Data Sheet (Säkerhetsdatablad) finns på beckman.com/techdocs

FÖRVARING OCH STABILITET

Det öppnade reagenset är stabilt fram till utgångsdatumet som anges på flaskan när det förvaras vid 2–8 °C i mörker. Får inte användas efter utgångsdatumet. Frys inte. Stem-Kit-reagenserna är stabila i 30 dagar efter det att flaskan med Stem-Count-fluorosfärer eller Flow-Count-fluorosfärer öppnats. Öppnade flaskor måste omedelbart förslutas igen efter användning och förvaras vid 2–8 °C i mörker. Alikvotera INTE Stem-Count-fluorosfärer eller Flow-Count-fluorosfärer från den ursprungliga flaskan.

VIKTIGT!

Risk för felaktiga resultat om läckage med Stem-Count-fluorosfärer eller Flow-Count-fluorosfärer inträffar. När Stem-Count-fluorosfärer eller Flow-Count-fluorosfärer har öppnats ska de förvaras i upprätt läge för att förhindra risken för läckage. Använd inte reagenser om det finns tecken på läckage.

Tecken på försämring

Tecken på försämring kan uppstå i följande situationer:

Stem-Kit-reagenser förutom Stem-Count-fluorosfärer

- En ändring i normalt utseende enligt listan nedan

Reagens	Normalt utseende
CD45-FITC / CD34-PE	Genomskinligt, svagt rosafärgad vätska
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Genomskinligt till svagt rosafärgad vätska
7-AAD Viability Dye	Genomskinlig, något rosafärgad till rödaktig vätska
NH ₄ CL-lyseringslösning	Genomskinlig, ofärgad vätska

Stem-Count Fluorospheres

- Utseendet, under insamling, på sekundära fluorescenta populationer som innehåller mer än 20 % av den totala populationen av fluorosfärer.
- En större variation i erhållna värden för antal eller prover.

VIKTIGT!

Reagenser ska inte användas om det finns tecken på försämring eftersom felaktiga resultat kan erhållas. Ring den lokala Beckman Coulter-representanten om det finns tecken på försämring.

Reagensberedning

1. CD45-FITC/CD34-PE och CD45-FITC/IsoClonic Control-PE-tvåfärgsreagenser används direkt från flaskan utan någon spädning.
2. Stem-Count-fluorosfärer eller Flow-Count-fluorosfärer används direkt från flaskan utan någon spädning. Allt aluminium från värmeförseglingen måste avlägsnas från toppen av flaskan när den öppnas första gången. Korrekta blandningar krävs. När Stem-Count-fluorosfärer eller Flow-Count-fluorosfärer används för första gången i början på dagen ska du vortexblanda i 3–5 sekunder.

Innan pipettering sker från flaskan, skaka försiktigt genom att vända upp och ned 3–5 gånger.

Efter den första vortexblandningen i början av dagen, låt flaskan med fluorosfärer gå tillbaka till 2–8 °C fram till användningen.

Undvik avdunstning och läckage genom att försluta flaskan ordentligt efter användning.

3. Viabilitetsfärgämnet 7-AAD används direkt från flaskan utan spädning.
4. En 1X NH₄Cl-lyseringslösning måste beredas varje dag: tillsätt nio volymer avjoniserat vatten till en volym 10X koncentrerad NH₄Cl-lyseringslösning. Kyl inte. Kassera oanvänd 1X NH₄Cl-lyseringslösning vid slutet av dagen.

Låt alla reagenser komma till rumstemperatur (18–25 °C) före användning.

PROVHANTERING

Krav på prover

Sammanfattning av provhantering:

Provtyp	Gatingmetod	Förvaringstemperatur	Provålder
Aferes	Algoritm	2–8 °C	24 timmar
	Manuellt	2–8 °C	24 timmar
Benmärg	Algoritm	2–8 °C	24 timmar
	Manuellt	2–8 °C	24 timmar
Navelsträngsblod	Algoritm	18–25 °C	24 timmar
	Manuellt	18–25 °C	24 timmar
Normalt helblod	Algoritm	18–25 °C	20 timmar
	Manuellt	18–25 °C	20 timmar
Mobiliserat helblod	Algoritm	18–25 °C	20 timmar
	Manuellt	18–25 °C	20 timmar

1. De biologiska proverna innehåller färskt normalt eller mobiliserat perifert helblod och färska eller tinade aferesprodukter, navelsträngsblod och benmärg.
2. Manipulerade eller renade hematopoietiska progenitorceller (HPC) kan endast analyseras med den manuella gatingmetoden.
3. Samla in aferesprodukter, prov med perifert blod, prov med navelsträngsblod eller benmärgsprover aseptiskt i ett sterilt evakuerat blodprovtagningsrör med ACD formel A eller K3 EDTA-antikoagulant.
4. Helblod och mobiliserade helblodsprov insamlade i antikoagulansrör kan förvaras i upp till 20 timmar i rumstemperatur (18–25 °C) före färgning.
5. Navelsträngsblodprover som samlas in i antikoagulansrör kan förvaras i upp till 24 timmar vid rumstemperatur (18–25 °C) före färgning.
6. Insamlade aferesprodukter och benmärgsprover kan förvaras i upp till 24 timmar vid 2–8 °C före färgning.
7. Före provberedning, säkerställ att koncentrationen vita blodkroppar (WBC) inte ÄR större än 30 x 10⁹ WBC-celler/L. Späd om nödvändigt provet med HBSS eller motsvarande för att uppnå ett genomsnittligt värde på 15 x 10⁹ WBC-celler/L. Anteckna spädningsfaktorn till beräkningen av det slutliga absoluta antalet för HPC.
8. Låga proteinkoncentrationer kan leda till att Stem-Count-fluorosfärer eller Flow-Count-fluorosfärer klumpar sig och ger felaktigt höga absolut antal celler. Spädning av prover med låg proteinkoncentration måste utföras med hjälp av en proteinberikad buffert.
9. Alla prover ska bearbetas med Stem-Kit-reagenser inklusive viabilitetsfärgämnet 7-AAD.

Förfarande vid Provbearbetning

Utför dubbla test enligt "The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry" (ISHAGE-riktlinjerna för CD34+-cellbestämning med flödescytometri) (1).

OBS! För bearbetning med Stem-Trol-kontrollceller, se bipacksedeln till Stem-Trol-kontrollceller för fullständiga anvisningar, om den manuella metoden används. I stemONE System Guide (systemguide för stemONE System) som medföljer stemONE System-programvaran eller stemCXP System Guide (systemguide för stemCXP System) som medföljer stemCXP System-programvaran finns fullständiga anvisningar om den automatiserade analysmetoden används.

1. För varje prov, märk tre provrör enligt följande:

- 45/34/7-AAD #1
- 45/34/7-AAD #2
- 45/CTRL/7-AAD

2. Pipettera 20 µL CD45-FITC-/CD34-PE-reagens i provrör: 45/34/7-AAD #1 och 45/34/7-AAD #2.

3. Pipettera 20 µL CD45-FITC/IsoClonic Control-PE-reagens i provröret: 45/CTRL/7-AAD.

4. Pipettera 20 µL av viabilitetsfärgämnet 7-AAD till alla provrör.

VIKTIGT! Det finns risk för ofullständig lysering om blodprov finns kvar på provrörets överdel eller sida. Var försiktig vid pipettering för att förhindra att blodet rör vid provrörets överdel eller sida. Rengör vid behov provröret med en bomullstopp för att ta bort alla spår av blodprov från överdelen eller sidan av provröret.

5. Använd en positiv förskjutningspipett eller en repeater-pipett och pipettera 100 µL av patientprovet i provröret.

6. Virvelblanda omedelbart provröret i 5 sekunder.

7. Inkubera alla provrör vid rumstemperatur (18–25 °C) i 20 minuter, i skydd mot ljus.

8. Efter inkubering, tillsätt 2 mL bered 1X NH₄Cl-lyseringslösning till varje provrör och vortexblanda omedelbart i 5 sekunder.

OBS! Uppgifter om beredning av lyseringslösningen finns i avsnitt 7.2 ovan med rubriken BEREDNING AV REAGENS.

VIKTIGT! Om luftbubblor pipetteras kan det leda till felaktiga resultat. Överdriven blandning av Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror kan leda till att det bildas luftbubblor. Blanda inte Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror för mycket, och pipettera inte luftbubblor till provrören.

9. Inkubera vid rumstemperatur i 10 minuter, i skydd mot ljus.

10. Blanda försiktigt Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror genom att invertera flaskan 3 till 5 gånger före användning.

11. Före insamling och direkt efter steg 9 ska du använda en positiv förskjutnings- eller repeater-pipett och pipettera 100 µL Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror i vart och ett av de tre provrören.

12. Vortexblanda omedelbart varje provrör i 5 sekunder.

OBS! Uppgifter om beredning av lyseringslösningen finns i avsnitt 7.2 ovan med rubriken BEREDNING AV REAGENS.

Sammanfattning av provfärgning

Reagenser/prover	45/34/7-AAD #1	Provrörsetikett 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD Viability Dye	20 µL	20 µL	20 µL
Prov	100 µL	100 µL	100 µL
Vortexa – inkubera i 20 minuter vid rumstemperatur. Skydda från ljus.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vortexa – inkubera i 10 minuter vid rumstemperatur. Skydda från ljus.			

Reagenser/prover	45/34/7-AAD #1	Provrörsetikett 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex			
Vänta inte mer än 60 minuter på is innan insamling för insamlade aferesprodukter, prover med navelsträngsblod eller benmärgsprover.			
Vänta inte mer än 45 minuter på is innan insamling för helblod och mobiliserade helblodsprover.			
Analysera tinade prover omedelbart.			
Skydda från ljus			

Stabilitet för bearbetade prover:

- Efter tillsats av Stem-Count eller Flow-Count-fluorosfärer i insamlade aferesprodukter, prover med navelsträngsblod eller benmärgsprover, vänta inte mer än 60 minuter på is innan insamling.
- Efter tillsats av Stem-Count eller Flow-Count-fluorosfärer i helblod och mobiliserade helblodsprover, vänta inte mer än 45 minuter på is innan insamling.
- För insamling från fryst prov ska analys utföras direkt efter tillsats av Stem-Count eller Flow-Count-fluorosfärer.
- Bearbetade prover måste förvaras på is skyddade från ljus och med så begränsad RT-exponering som möjligt under insamling.

INNEHÅLL

Konservationsmedlet natriumazid kan bilda explosiva föreningar i avloppsledning av metall. Se NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (76-8-16) (Bulletin från den amerikanska motsvarigheten till arbetsmiljöverket: Fara för azidexplosion). För att undvika risken för ansamling av azidföreningar ska avloppsrören spolas igenom med vatten efter att utspädda reagenser har kasserats. Kassering av natriumazid måste ske i enlighet med tillämpliga lokala regler.

MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE FÖLJER MED KITET:

1. Avjoniserat vatten.
2. Hanks balanserade saltlösning (HBSS, Hanks Balanced Salt Solution) eller motsvarande
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Som ett alternativ till Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
9. Isvattenbad
10. Plastprovör (12 x 75 mm)
11. Kalibrerad repeater-pipett (20 µL, 100 µL, 2 mL) och spetsar eller kalibrerad positiv förskjutningspipett (20 µL, 100 µL, 2 mL) och spetsar
12. Kalibrerad standardpipett (20 µL, 100 µL, 2 mL) och spetsar.
13. Virvelblandare (Vortex).
14. Timer.
15. Flödescytometer.
16. stemCXP 2.0-programvarusats, stemCXP version 2.0, WIN 7, ENDAST för automatiserad analys av prov på FC 500 flödescytometersystem med CXP-programvara (version 2.0).

RESULTAT

Inställning av analysprotokoll

Flödescytometern måste kunna detektera framåtspridning, sidospredning och fyra fluorescenskanaler. Använd ett 620 nm bandpassfilter för kanal FL3 (för övervakning av Stem-Count- eller Flow-Count-fluorosfärer). Använd ett 675 nm långpassfilter för kanal FL4 (för 7-AAD-viabilitetsfärgövervakning).

Säkerställ att flödescytometern är korrekt inriktad och standardiserad för fluorescensintensitet.

Se till att flödescytometern är rätt justerad för fluorescenskompensation.

OBS!

För provanalys är alla regionpositioner ungefärliga fram till insamlingen av provröret 45/34/7-AAD #1. Regioner optimeras enligt följande protokoll och justeras sedan INTE för det andra och tredje provröret i panelen.

En serie med 8 histogram och ett gatingschema måste följas för provanalys (se nedan). Samma serie med 8 histogram och gatingschema måste följas när CD34+-kontrollceller används. Region A, B, C och D ska anpassas (se avsnittet "Skapa regioner" för definition av regioner) så att de inkluderar CD34+-kontrollcellernas karaktäristiska kluster.

Skapa Histogram:

Skapa histogram enligt följande:

1. Skapa histogram 1 som FL1 CD45-FITC jämfört med sidospredning.
2. Skapa histogram 2 som FL2 CD34-PE jämfört med sidospredning.
3. Skapa histogram 3 som FL1 CD45-FITC jämfört med sidospredning.
4. Skapa histogram 4 som framåtspredning jämfört med sidospredning.
5. Skapa histogram 5 som FL1 CD45-FITC jämfört med FL2 CD34-PE.
6. Skapa histogram 6 som framåtspredning jämfört med sidospredning.
7. Skapa histogram 7 som Time (Tid) jämfört med FL3 Stem-Count eller Flow-Count-fluorofäror.
8. Skapa histogram 8 som viabilitetsfärgämnet FL4 7-AAD jämfört med sidospredning.

Histogram 1 till 4 är avsedda att karaktärisera CD34+ HPC, en process som kan senareläggas till analyssteget. Dessa första fyra histogram är konfigurerade i enlighet med ISHAGE-riktlinjerna för CD34+-cellbestämning med flödescytometri (1, 2). Histogram 5 till 7 är avsedda för övervakning av parametrar som är av vikt under insamlingssteget. De inkluderar diskriminatoren för Forward Scatter (framåtspredning), antalet CD45+-händelser som ska samlas in och korrekt ackumulering av singletta fluorofäror.

Histogram 8 är avsett att skilja mellan och analysera livskraftiga och icke-livskraftiga händelser.

Skapa Region

Skapa regioner enligt följande:

1. Histogram 1 – skapa en rätlinjig region A på histogram 1 som ska inkludera alla CD45+-leukocyter och avlägsna trombocyter, rester av röda blodkroppar och aggregat.
2. Histogram 1 – Skapa en amorf E-region på histogram 1 som inkluderar lymfocyterna (ljusstarka CD45, låg sidospredning).
3. Histogram 2 – skapa en rätlinjig B-region på histogram 2 som ska inkludera alla CD34+-händelser. Ställ in ett stoppantal på 75 000 händelser (CD45+-händelser) för histogram 2.
4. Histogram 3 – skapa en amorf region C på histogram 3 som ska inkludera alla CD45dim-klusterhändelser.
5. Histogram 4 – skapa en amorf region D på histogram 4 som ska inkludera alla klusterhändelser med medelhög side scatter (sidospredning) och medelhög till hög forward scatter (framåtspredning).
6. Histogram 5 – skapa en Quadstat-region I på histogram 5 för att verifiera den nedre gränsen för CD45-uttryck på CD34+-händelser.
7. Histogram 5 – skapa en amorf H-region på histogram 5 som ska omge alla Stem-Count eller Flow-Count-fluorofäror, inklusive dubletter. H-regionen ska vara placerad i det övre högra hörnet av histogram 5.

OBS!

Säkerställ att region H ritas som en AMORPHOUS (amorf) region.

8. Histogram 5 – Skapa rätlinjig K-region (benämnd "listgate –") på histogram 5. Ställ in K-regionens gränser vid första log-dekad i de två parameterhistogrammen. Denna K-region gör det möjligt att avlägsna dubbla negativa händelser under insamlingen för analys av 75 000 relevanta CD45+-händelser.
9. Histogram 6 – kopiera region D från histogram 4 som region F i histogram 6.
10. Histogram 7 – Skapa en rätlinjig G-region på histogram 7 som ska inkludera enbart singletta Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror. G-regionen kan etiketteras "CAL" (kalibrering) för att möjliggöra automatisk beräkning av absoluta antal CD34+ HPC (mer information finns i instrumentets bruksanvisning).
11. Histogram 8 – Skapa en rätlinjig J-region på histogram 8 så att livskraftiga leukocyter inkluderas (negativa händelser för viabilitetsfärgämnet 7-AAD).

Skapa Gate

Skapa gates enligt följande:

1. Histogram 1 – Tilldela "J" till histogram 1 för visning av alla livskraftiga händelser. Om 7-AAD inte används, tilldela region "H" till histogram 1 för att visa alla händelser med undantag av alla Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror inklusive dubletter.
2. Histogram 2 – Tilldela "AJ" ("A" om 7-AAD inte används) till histogram 2 för att visa livskraftiga (totala om 7-AAD inte används) CD34+-händelser.
3. Histogram 3 – Tilldela "A" och "B" och "J" ("A" och "B" om 7-AAD inte används) till histogram 3 för att visa alla livskraftiga (totala om 7-AAD inte används) CD45+/-CD34+-händelser.
4. Histogram 4 – Tilldela "A" och "B" och "C" och "J" ("A" och "B" och "C" om 7-AAD inte används) till histogram 4 för att visa livskraftiga (totala om 7-AAD inte används) CD45+/-CD34+-klustrade händelser med låg sidospridning samtidigt som trombocyter och skräp utesluts. Händelser från region ABCDJ är faktiska livskraftiga CD34+ HPC.
5. Histogram 5 – ogated för visning av alla händelser.
6. Histogram 6 – Tilldela "EJ" ("E" om 7-AAD inte används) till histogram 6 för att visa livskraftiga (totala om 7-AAD inte används) lymfocyter liksom en visuell kontroll av diskriminators.
7. Histogram 7 – Tilldela "H" till histogram 7 för visning av alla Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror, inklusive dubletter.
8. Histogram 8 – tilldela "A" till histogram 8 för visning av CD45+-händelser.

Inställning för flödescytometri

1. Verifiera att flödescytometern är korrekt inriktad och optimerad för ljusspridnings- och fluorescensintensiteter för FL1-, FL2-, FL3- och FL4-detektorer enligt tillverkarens och laboratoriets riktlinjer. Kontrollera att färgkompensation har ställts in för standardanvändning. Ytterligare instruktioner finns i instrumentets bruksanvisning.
2. Vortexa provrören i 5 sekunder.
3. Utför datainsamling på flödescytometern. Minst 75 000 CD45+-händelser måste analyseras.
4. För provanalys: Justera diskriminators och regionerna genom att analysera provröret 45/34/7-AAD #1. Spara protokollet och analysera provrör 45/34/7-AAD #2 och provrör 45/CTRL/7-AAD utan ytterligare justeringar.

Analysexempel

Histogrammen i BILAGA visas i stigande nummerordning så som de visas i protokollet.

Beräkning av CD34+ HPC för prov

Antalet CD34+ HPC beräknas som medelvärdet för de statistiska resultaten för region D för de två replikatproverna (dvs. 45/34/7-AAD #1 och 45/34/7-AAD #2).

CD34+ HPC-resultaten anses vara giltiga om resultaten som erhålls av CD45-FITC/IsoClonic Control-PE-reagenset är mindre än 10 % av CD34+ HPC-resultaten.

1. Beräkna medelvärdet för resultaten från provrören 45/34/7-AAD #1 och 45/34/7-AAD #2 för varje prov (dvs. medelvärdet för de utskrivna statistikresultaten för region D). Antalet CD34+ HPC kan falla inom 10 % av medelvärdet för duplikatproverna. Värdet som erhålls med kontrollprovröret 45/CTRL/7-AAD måste motsvara mindre än 10 % av medelvärdet som erhålls från provrören i testet för att validera resultaten.

ANMÄRKNINGAR: Om medelvärdet för det absoluta antal som erhöles för dublett-CD34+ HPC hamnar utanför det accepterade området (dvs. överskrider 10 %), avgör om pipetteringen har utförts korrekt, i synnerhet för Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror. Kontrollera visuellt flödescytometers rapporter och kvaliteten på färgnings- och lyseringsprocesserna i provrören. Kontrollera på vilket sätt regionernas gränser ställdes in.

Om värdet som erhålls med 45/CTRL/7-AAD hamnar utanför området med accepterade värden (dvs. överskrider 10 % av det genomsnittliga absoluta antal som erhöles för dubletten), fastställ om pipettering har utförts korrekt, i synnerhet för Stem-Count-fluorofäror eller Flow-Count-fluorofäror. Kontrollera visuellt flödescytometers rapporter och kvaliteten på färgnings- och lyseringsprocesserna i provrören. Kontrollera på vilket sätt regionernas gränser ställdes in.

Upprepa vid behov insamlingssteget med ett tillagt BLANK-provrör efter första duplikatprovrör 45/34/7-AAD #1 och #2 och före provröret 45/CTRL/7-AAD. Upprepa vid behov hela beredningen med nya provrör med tillägg av BLANK-provrör. Samla in och analysera både den nya serien provrör och den föregående serien. Jämför de båda resultaten. Om överensstämmelse saknas bör du kontakta den lokala representanten för Beckman Coulter.

2. Om provet har späts MÅSTE resultatet som erhållits enligt ovan multipliceras med lämplig spädningsfaktor (Dil). Det slutligen erhållna resultatet är det absoluta antalet CD34+ HPC (celler/ μ L).

$$\text{Absoluta antal för CD34+ HPC (celler}/\mu\text{L)} = \text{Utskriftsresultat för absolut antal CD34+ HPC (celler}/\mu\text{L)} \times \text{Dil}$$

3. För aferesförpackningar kan det totala antalet CD34+ HPC per förpackning beräknas med hjälp av följande formel:

$$\text{Totalt antal CD34+ HPC per förpackning} = \text{absolut antal CD34+ HPC (celler}/\mu\text{L)} \times 10^6 \times \text{förpackningsvolym (L)}$$

Där:

4. För andelen CD34+ HPC i beräkningen av värdet av CD45+-leukocyter, se följande formel:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Absolut antal CD34+ HPC (celler}/\mu\text{L)} \text{ (dvs. resultat av region D-utskrift)}}{\text{Absoluta antal CD45+-leukocyter (celler}/\mu\text{L)} \text{ (dvs. resultat av region A-utskrift)}} \times 100$$

KVALITETSKONTROLL

Säkerställ att flödescytometern är korrekt inriktad enligt tillverkarens rekommendationer i instrumentets bruksanvisning. Målintensiteter har fastställts för att optimera instrumentets inställningar för ljusspridning och fluorescens för analys av prover färgade med CD45-FITC/CD34-PE monoklonalt antikroppsreagens och CD45-FITC/Isoclonic Control-PE-reagens.

Fluorokromer fluoresceinisotiocyanat (FITC), fykoerytrin (PE) och färgämnet 7-Amino Actinomycin D (7-AAD) utstrålar vid olika våglängder, men de har en del spektral överlappning som måste korrigeras med hjälp av elektronisk kompensering. Optimala kompenseringsnivåer kan fastställas genom att i ett histogram med dubbla parametrar analysera ett helblodsprov spetsat med Stem-Trol Control Cells färgade med viabilitetsfärgämnet 7-AAD och lämpliga kompenseringsreagenser när CXP-programvara används. I denna analys görs justeringar för att säkerställa att ingen färgning sker i tvåfärgskvadranten med någon enskild fluorokrom.

Viabilitetsfärgämnet 7-AAD (7-Amino Actinomycin D) används för att identifiera icke-livskraftiga celler genom flödescytometrisk analys så att livskraftiga celler av intresse kan räknas. Färgämnet tas upp av döda celler (ljusa händelser) som sedan utesluts från livskraftiga celler (negativa händelser) med hjälp av gating (se histogram 8).

Innan prover analyseras ska en analyserad kontroll (Stem-Trol-kontrollceller) färgas för att verifiera antikroppsreaktivitet.

PRESTANDA

De prestandaegenskaper som tillhandahålls är baserade på Stem-Kit-reagenser som används med COULTER EPICS XL/XL-MCL-flödescytometer med System II-programvara. Exempel på prestanda på en FC 500 med CXP-programvara finns i stemCXP System Guide (systemguide för stemCXP System).

Förväntade värden för referensintervallen

Normala helblodprover (n = 117) insamlades från en population med män (n = 58) och kvinnor (n = 59) för att fastställa ett normalt referensområde. Denna studie utfördes vid ett externt utvärderingsställe. Replikattester för varje prov bereddes enligt bipacksedeln till Stem-Kit-reagenserna. Manuell gating och analys utfördes för att erhålla värden för CD45+, CD34+ och CD34 %.

Den statistiska analysen antyder en icke-gaussisk fördelning av insamlade data. Baserat på dessa fynd används en icke-parametrisk (robust) metod för att analysera data. Värden för CD45+, CD34+ och CD34 % erhöles. Värden uttrycks som absoluta antal (celler/ μ L) för CD45+ och CD34+ och procentandel av totala antalet leukocyter (CD34 %) enligt tabellen nedan.

Normalt helblod: Referensområden

Manuell metod (robust analys)	n	CD45+ (celler/ μ L)				CD34+ (celler/ μ L)				CD34+ (%)			
		Min	max	Medelvärde	SD	Min	max	Medelvärde	SD	Min	max	Medelvärde	SD
Manual (Manuellt)	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Dessa värden är endast avsedda att vara representativa. Varje laboratorium ska fastställa sina egna förväntade värden utifrån den lokala populationen med normala donatorer.

Linearitet

Replikatmätningar gjordes vid en av 10-seriespädningar för 2 typer av prover: CD34+-spetsat perifert helblod och färskt mobiliserat perifert helblod. Ett dynamiskt område på 0 till 2 000 celler/ μ L och ett område för känslighet i låga änden på 0 till 150 celler/ μ L uppnåddes för koncentrationer av CD34+ HPC. Prover bereddes enligt bipacksedeln till Stem-Kit-reagenserna och analyserades på en COULTER EPICS XL/XL-MCL-flödescytometer. Värden uttrycks som absoluta antal (celler/ μ L).

Resultaten analyserades med linjära regressionsanalyser för förväntade jämfört med erhållna absoluta antal för medelvärdet av replikat minus endogena CD34+-celler. Se följande tabeller.

Lutningarna på de regressionslinjer som tillhandahålls med kurvorna för totala absoluta antal CD34+ HPC visar linjäritetens matematiska mått. Detta stöds av minimal potentiell analysbias så som det visas av y-skärningspunkterna för analyserna. Förväntade absoluta antal uppvisar hög korrelation med de erhållna absoluta antalen.

Resultat för helblod spetsat med CD34+

Se diagram i bilagan.

Resultat för perifert (mobiliserat) blod

Se diagram i bilagan.

Metodens noggrannhet (tabeller) (förväntade jämfört med erhållna resultat)

Metodens noggrannhet definieras som graden av överensstämmelse mellan förväntade och erhållna resultat för både manuella och automatiserade gating- och analysmetoder. Färskt normalt perifert helblod spetsades med renade CD34+-celler till en nivå på 1 875 celler/ μ L. Cellantal bekräftades med en Malassez-objektglashemacytometer och späddes serIELt till olika koncentrationer. Förväntade resultat jämför med erhållna resultat för medelvärdet av duplikatmätningar med hjälp av automatiserad och manuell gating och analys för varje spädningsnivå. Testning för lutning och ordinator vid skärningspunkten uppvisar ingen statistisk skillnad mellan automatiserad gating och analys och de förväntade resultaten och inte heller mellan manuell gating och analys och förväntade resultat.

Metodens noggrannhet – CD34+ (%)

Se diagram i bilagan.

Metodens noggrannhet – Absolut antal CD34+ (celler/ μ L)

Se diagram i bilagan.

Metodens noggrannhet – totalt antal leukocyter – CD45+ (celler/ μ L)

Se diagram i bilagan.

Metodens tillförlitlighet (automatisk kontra manuella resultat)

Noggrannhetsgraden mellan den automatiserade och den manuella metoden på stemONE System studerades på fyra externa utvärderingsställen med hjälp av färskt perifert helblod och färska eller tinade prover med aferes, navelsträngsblod och benmärg. Konfidensintervallerna (CI) beräknades med gränser på 95 %.

Prover med färskt perifert helblod (n = 59 från tre ställen), färska aferesprodukter (n = 51 från tre ställen), färskt navelsträngsblod (n = 29 från två ställen), färsk benmärg (n = 33 från två ställen), tinade aferesprodukter (n = 23 från ett ställe), tinat navelsträngsblod (n = 31 från två ställen) och tinad benmärg (n = 20 från ett ställe) bereddades enligt bipacksedeln till Stem-Kit-reagenserna och analyserades på COULTER EPICS XL/XL-MCL-flödescytometrar. Automatiserad och manuell gating och analys utfördes för att erhålla värden för CD45+, CD34+ och CD34 %.

Noggrannhet för metoder (figurer)

Prover med färskt perifert helblod (n = 59)

Se diagram i bilagan.

Prover med färsk aferes (n = 51)

Se diagram i bilagan.

Prover med färskt navelsträngsblod (n = 29)

Se diagram i bilagan.

Färska benmärgsprover (n = 33)

Se diagram i bilagan.

Prover med tinad aferes (n = 23)

Se diagram i bilagan.

Prover med tinat navelsträngsblod (n = 31)

Se diagram i bilagan.

Tinade benmärgsprov (n = 20)

Se diagram i bilagan.

Precision

Precision mellan laboratorier

Studier genomfördes på en klinisk anläggning av tre operatörer, som alla använde olika flödescytometrar. Tre prover som representerade det dynamiska området för CD34+ (0–2 000 celler/ μ L) identifierades:

Lågt område:	färskt, mobiliserat perifert blod
Mittenområdet:	aferesprodukt
Högt område:	aferesprodukt

Dessa prover delades in i tre alikvoter, en alikvot i varje nivå (låg, medel, hög) och gavs till alla tre operatörerna. Prover bereddes (n = 10) från varje alikvot enligt bipacksedeln till Stem-Kit-reagenserna. Varje operatör utförde analys på en EPICS XL-flödescytometer med hjälp av automatiserad och manuell gating och analys för att erhålla värden för CD45+, CD34+ och CD34 %. Värden uttrycks som procentandel (%) av totalt antal leukocyter och som absoluta antal (celler/ μ L).

Resultat från studien av precision mellan laboratorier, efter nivå, anges i följande tabeller. Värdena som erhöles för absoluta antal av CD45+ och CD34+ och procentandelar CD34 visade liten variation så som det visades med medelvärdena, standardavvikelseerna och variationskoefficienterna för replikatmätningarna.

Se diagram i bilagan.

Precision inom laboratorier

Prover som täcker analysens dynamiska område erhöles genom att använda färskt perifert helblod, färsk benmärg samt färsk och tinad aferes samt färskt och tinat navelsträngsblod från fyra externa utvärderingsställen. Tio prover från vart och ett bereddes enligt bipacksedeln till Stem-Kit-reagenserna och analyserades på COULTER EPICS XL/XL-MCL-flödescytometrar med hjälp av manuell gating och analys för att erhålla värden för CD45+, CD34+ och CD34 %.

Värdet för CD45+, CD34+ och CD34 % som anges i följande tabeller visar att analysmetoden är reproducerbar så som det bevisas av medelvärdena, standardavvikelseerna och variationskoefficienterna för dessa mätningar. Datatabellerna som visas i BILAGAN visar precisionen inom laboratorier för analysen.

Se diagram i bilagan.

BEGRÄNSNINGAR

Se guiden för stemCXP-systemet som medföljer stemCXP-systemprogramvaran för begränsningar om du använder den automatiserade metoden.

- Färgade och lyserade prover måste förvaras på is och analyseras på flödescytometern enligt informationen i avsnittet "Stabilitet för bearbetade prover", annars kan resultaten bli felaktiga.
- Reagensen får ej spädas, portioneras eller frysas. Använd dem endast direkt ur originalförpackningen.
- Reagenserna är endast avsedda för användning med flödescytometri.
- Tina frusna prover ordentligt för att säkerställa optimal färgning.
- Alla röda blodkroppar lyseras eventuellt inte under följande omständigheter: närvaro av kärnförande röda blodkroppar, onormal proteinkoncentration eller hemoglobinopati. kan orsaka falskt minskade CD34 %-resultat på grund av att olyserade röda blodkroppar räknas som leukocyter. Absoluta antal för CD34+ och CD45+ bör inte påverkas.
- Vissa patienter kan uppvisa speciella problem på grund av ändrade eller mycket låga antal av vissa cellpopulationer.
- Resultat som erhöles med flödescytometri kan vara felaktigt om gaterna är felaktigt inställda.
- Stem-Kit-reagenser är avsedda att använda viabilitetsfärgämnet 7-AAD för att fastställa livskraftiga HPC-celler. Om ditt laboratorium använder en annan metod för fastställande av viabilitet, följ allmän god laboratoriesed och ditt laboratoriums kvalitetskontrollprocedurer för att säkerställa kvaliteten hos de rapporterade resultaten.

VARUMÄRKEN

Beckman Coulter, den stiliserade logotypen och Beckman Coulters produkt- och tjänstmärken som nämns här är varumärken eller registrerade varumärken som tillhör Beckman Coulter, Inc. i USA eller andra länder.

YTTERLIGARE INFORMATION

www.beckmancoulter.com

Teckenförklaring för symboler

Ordlista för symboler finns på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

Stem-Sett Reagenser

REF IM3630 50 tester

For *in vitro*-diagnostisk bruk

TILTENKT BRUK

Stem-Kit-reagenser består av et tofarget fluorescerende (FITC, PE) monoklonalt murint antistoffreagens, en tofarget fluorescerende (FITC, PE) murin isoklonisk kontroll, et reagens for absolutte tall, et reagens for bestemmelse av celleviabilitet og et lyseringsreagens. Det er beregnet «for *in vitro*-diagnostisk bruk» for samtidig identifikasjon og telling av CD45+ og dobbeltpositive CD45+/CD34+-cellepopulasjonsprosenter og absolutte tall i biologiske prøver ved flowcytometri. Biologiske prøver inkluderer friskt, normalt eller mobilisert perifert fullblod og friske eller opptinte afareseprodukter, navlestrengblod og benmarg. Målinger av cellepopulasjoner kan oppnås ved hjelp av enten en automatisk eller manuell metode til gating og analyse.

Fullstendig veiledning finnes i dette pakningsvedlegget for Stem-Kit-reagensene hvis det brukes en manuell metode. Se stemCXP System Guide (Systemveiledning for stemCXP) som følger med stemCXP 2.0-programvarepakken og stemCXP versjon 2.0, WIN 7, for komplette instruksjoner hvis du bruker den automatiserte metoden.

SAMMENDRAG

Hematopoietiske progenitorceller (HPC)

Stem-Kit-reagenser er beregnet på å identifisere humane hematopoietiske progenitorceller (HPC) ved hjelp av følgende kriterier: «Sanne CD34+-celler (a) uttrykker CD34-antigen, (b) uttrykker CD45-antigen med en fargingsintensitet karakteristisk for blastceller (dvs. lett påviselige, men i lavere nivåer enn lymfocytter og monocytter), og (c) viser liten sidevinkel- og liten til middels fremadvinkelspredning som er karakteristisk for blastceller» (1). Eksklusjon av døde CD34+-HPC fra telling av levende CD34+-HPC oppnås ved hjelp av 7-AAD-viabilitetsfargestoffet (2).

CD34

CD34-antigenet er en familie av differensielt glykosylerte type I transmembrane, enkeltkjedede glykoproteiner (3, 4, 5). Det uttrykkes på praktisk talt alle hematopoietiske forløperceller medregnet multipotente stamceller. CD34-epitoper er blitt inndelt i tre klasser basert på følsomheten for neuraminidase og hemolytisk Pasteurella-glykoprotease (6). Det monoklonale CD34-antistoffet (mAb) som brukes i Stem-Kit-reagenser, betegnes 581. Det gjenkjenner spesifikt en klasse III-epitop av CD34-molekylet (7) som definert ved enzymatiske kløyvingsmønstre (6, 8). Dette monoklonale 581-antistoffet ble tildelt til CD34 under 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5. HLDA-workshop om humane leukocytt-differensieringsantigener) i Boston, Massachusetts, USA, i 1993 (7).

CD45

CD45-antistoffet gjenkjenner medlemmer av CD45-familien av pan-leukocyttantigener med molekylvekt på 180, 190, 210 og 220 kD (9, 10, 11). Det er også kjent som det felles leukocyttantigen (LCA). CD45-antigenet uttrykkes på alle typer hematopoietiske celler unntatt modne røde blodceller og deres umiddelbare progenitorer (11, 12). Det er ikke blitt påvist i differensiert ikke-hematopoietisk vev (12, 13, 14, 15). CD45-mAb brukt i Stem-Kit-reagenser betegnes J33. Det ble tildelt til CD45 under 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3. HLDA-workshop om humane leukocytt-differensieringsantigener) i Oxford, England i 1986 (16).

7-AAD

7-aminoaktinomycin D (7-AAD)-viabilitetsfargestoff er en analog til aktinomycin D, som inneholder en substituert aminogruppe i 7. posisjon i kromoforen. 7-AAD-viabilitetsfargestoffet interkalierer mellom cytosin- og guaninbasene i DNA-et (15). Aktinomyciner er biologisk aktive forbindelser som inneholder en 2-amino-4, 6 dimetylphenoksazon-3-kromofor og to sykliske pentapeptider (17). Aktinomyciner danner stabile komplekser med dobbelttrådet deoksyribonukleinsyre (DNA), men ikke med verken dobbelttrådet ribonukleinsyre (RNA) eller RNA-DNA-hybrider eller enkelttrådet DNA eller RNA (15, 18).

De spektrale egenskapene ved 7-AAD-viabilitetsfargestoffet gjør dette molekylet særlig egnet til flowcytometri (17). Den maksimale absorpsjon for 7-AAD/DNA-komplekset befinner seg i den grønne spektralregionen og er således egnet til et cytometer utstyrt med en argonleser (eksitasjonsbølgelengde på 488 nm) (15). Den dyprøde fluorescenseemisjonen av 7-AAD-viabilitetsfargestoffet (635 til 675 nm) gjør bruken av denne proben lettere i kombinasjon med fluoresceinisotiocyanat (FITC) og fykoerytrin (PE)-konjugerte antistoffer fordi 7-AAD/DNA-komplekset i motsetning til propidiumjodid (PI) viser minimal spektral overlapping med FITC og PE (17).

Apoptotiske, nekrotiske celler og/eller ødelagte celler er en kilde til interferens i analysen av levende celler ved flowcytometri. Døde celler evalueres og diskrimineres ved fokusering på 7-AAD-positiv farging, mens levende celler forblir ufarget (negative) (19).

Flowcytometersystemer

Flowcytometersystemer (FC 500) bruker flowcytometriprinsippet for å analysere biologiske prøver med henblikk på å identifisere forskjellige cellepopulasjoner bestemt av de anvendte spesifikke monoklonale antistoffene og fluorokromene. Den foreliggende testen bruker FC 500-flowcytometersystemene utstyrt med CXP-systemprogramvare for å analysere prøver.

PRINSIPP

Denne testen avhenger av et monoklonalt antistoffs evne til å binde til overflaten av celler som uttrykker diskrete antigendeterminanter. CD45-FITC/CD34-PE-reagenset i Stem-Kit-reagenser er en kombinasjon av to monoklonale murine antistoffer, som hver især er konjugert til et spesifikt fluorokrom og er spesifikke for hvert sitt overflateantigen. Spesifikk farging av celleoverflaten avstedkommes ved inkubasjon av dobbeltprøver av en biologisk prøve med det tofargede CD45-FITC/CD34-PE-reagenset.

En ytterligere test av den samme prøven farges med CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagenset for å kontrollere for uspesifikk binding av det monoklonale CD34-PE-antistoffet. 7-AAD-viabilitetsfargestoffet, et nukleinsyrefargestoff som binder til tilgjengelige basepar (cellulært DNA), brukes til å skjelne levende celler fra døde celler. De røde blodcellene i prøvene lyseres med NH₄Cl-lyseringsløsning klargjort 1X. Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer (reagenset for absolutte tall) tilsettes, og de øvrige cellene analyseres ved flowcytometri. Prosesskontroll og kvalitetskontroll, for analysen, frembringes av instrumentet og prøve kvalitetskontrollreagenser: Flow-Check-fluorofærer, Flow-Set-fluorofærer, passende kompensasjonsreagenser og Stem-Trol Control Cells.

EKSEMPLER PÅ KLINISKE ANVENDELSESOMRÅDER

En kronologi av vitenskapelige rapporter om hematopoietiske progenitorceller (HPC) viser at tidlige studier var basert på tellinger av kjernebærende celler med henblikk på kvantifisering. Etterfølgende studier som involverte assays for kolonidannende enheter (CFU), frembrakte grove approksimasjoner av populasjoner av progenitorceller. De tidkrevende CFU-assays ble etterfulgt av oppdagelsen av celleoverflatemolekylet CD34. CD34 ble funnet å være til stede på overflaten av tidlige hematopoietiske celler og hematopoietiske kolonidannende celler i benmarg og perifert blod (20). Det ble utviklet monoklonale antistoffer rettet mot CD34-molekylet, som ble brukt i flowcytometri. CD34-bestemmelser ved flowcytometri er nå bredt akseptert som en metode til å vurdere hematopoietiske progenitorceller og stamceller.

I benmarg hos normale individer er 1 til 3 % av de cellene som uttrykker CD34-antigenet, i stand til å rekonstituere langvarig multilinje-hematopoiese (3, 20). I perifert blod hos normale individer uttrykker mindre enn 0,1 % av de sirkulerende cellene CD34-antigenet (1, 21). Bruk av Stem-Kit-reagenser tilveiebringer en enkel, hurtig og sensitiv flowcytometrisk metode til telling av hemopoietiske progenitorceller og stamceller i perifert blod, leukofereseprodukter, benmarg og navlestrengblod.

REAGENSETS INNHOLD

Stem-Kit-reagenser inneholder følgende:

- CD45-FITC / CD34-PE-reagens (45/34) – 1 flaske.
- CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagens (45/CTRL) – 1 flaske.
- Stem-Count-fluorofærer – 1 flaske.
- 7-AAD-viabilitetsfargestoffet – 1 flaske.
- 10X NH₄Cl-lyseringsløsning – 2 flasker.

1. Disse reagensene må brukes som et sett som levert i pakken.

Flow-Count-fluorofærer, som er ekvivalent med Stem-Count-fluorofærer, kan brukes til bestemmelse av absolutte tall ved hjelp av den spesifikke testede konsentrasjonen.

2. CD45-FITC/CD34-PE er et bruksklart tofargingsreagens levert i 2,2 mL fosfatbufferjustert saltvannsløsning (PBS) inneholdende 2 mg/mL bovint serumalbumin (BSA) og 0,1 % natriumazid som konserveringsmiddel.
3. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE er et bruksklart tofargingsreagens levert i 1,2 mL PBS inneholdende 2 mg/mL BSA og 0,1 % natriumazid som konserveringsmiddel. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagenset er en blanding av ukonjugert og PE-konjugert (CD34-identisk) monoklonalt 581-antistoff. Denne blandingen virker som en passende isomorfologisk kontroll med henblikk på å kontrollere uspesifikk binding av CD34-PE-mAb i alle prøver.

MERK: CD45-FITC / CD34-PE- og CD45-FITC / IsoClonic Control-PE -reagensene skal brukes sammen. Når testene og kontrollene utføres, skal det kontrolleres at begge reagenser har det samme lotnummer på flaskeetiketten.

Sammenfatning av antistoffenes egenskaper

Spesifisitet	CD45	CD34
Klon	J33	581
Hybridom	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig-kjede	IgG1, κ-lettkjeder	IgG1, κ-lettkjeder
Art	Mus	Mus
Konjugasjon	Fluoresceinisotiocyanat (FITC)	R fykoerytrin (PE)
Molart forhold	5–8 mol FITC / mol Ig	0,5–1,5 mol PE / mol Ig
Eksitasjonsbølgelengde	488 nM (blågrønn)	488 nM (blågrønn)
Fluorescensemissjon	504 til 541 nm (hovedsakelig grønn)	568 til 590 nm (hovedsakelig oransje)

4. Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer består av 10 µm store (nominell diameter) fluorescerende polystyrenmikrosfærer i 20 mL vandig suspensjonsmedium inneholdende et overflateaktivt middel og 1 % formaldehyd. Hver fluorofære inneholder en farge som har et fluorescensutstrålingsområde på 525 nm til 700 nm når den eksiteres ved 488 nm. Den testede konsentrasjon av Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer (fluorofærer/µL) avledes ut fra multiple dobbeltanalyser ved hjelp av en COULTER partikkelstørrelsesanalysator. Den lotspesifikke verdien er påtrykt flaskeetiketten.
5. 7-AAD-viabilitetsfargestoffet leveres i 99 % fosfatbufferjustert saltvannsløsning (PBS: 0,01 M natriumfosfat, 0,145 M natriumklorid, pH 7,2) med 1 % dimetylsulfoksid (DMSO).
6. NH₄Cl-lyseringsløsning leveres som en 10X konsentrert 20 mL løsning. Den inneholder en blanding av ammoniumklorid (NH₄Cl), kaliumbikarbonat (KHCO₂), dinatriumetylendiamintetraeddiksyre (EDTA).

ADVARSEL OG FORHOLDSREGLER

1. Preparater av monoklonale antistoffer inneholder 0,1 % natriumazid. Natriumazid danner under sure betingelser hydrogenazid, en ekstremt giftig forbindelse. Kassering gjennom kloakksystemet skal skje sammen med store mengder vann for å unngå farlig opphoping i metallrør og mulige eksplosjoner.
2. Prøver og alt materiale som kommer i kontakt med dem, skal håndteres som smittefarlige og kasseres under iakttakelse av passende forholdsregler.
3. Pipetter aldri med munnen, og unngå at prøver eller reagenser kommer i kontakt med huden eller slimhinner.
4. Ikke bruk reagenser etter utløpsdatoen som er trykt på flaskens etikett.
5. Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer inneholder 1 % formaldehyd. Unngå kontakt med huden og øynene, ettersom formaldehyd kan forårsake varig helseskade på disse vevene. Unngå innånding av damper. Bruk egnet verneutstyr som hansker og vernebriller.
6. Ikke utsett Stem-Kit-reagenser for kraftig lys eller varme under oppbevaring eller bruk.
7. Unngå fordamping og lekkasje av Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, siden det i så fall kan oppstå feilaktige resultater. Lukk lokket tett og oppbevar flasken stående.
8. Påse at fluorofærene resuspenderes fullstendig før bruk. Unngå overdreven blanding for å minimere formasjon av luftbobler. Ikke pipetter luftbobler, siden dette ellers kan føre til feilaktige resultater.
9. Bruk en kalibrert pipette (fortrengnings- eller repeterpipette foretrekkes) til dispensering av prøver og Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, siden det ellers kan oppstå feilaktige resultater.
10. Bruk pipetteringsteknikker som pipetteprodusenten anbefaler for å sørge for nøyaktig og presis pipettering av prøver og Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, siden det ellers kan oppstå feilaktige resultater.
11. Fargede og lyserte prøver skal oppbevares på is og analyseres på flytcytometeret i samsvar med informasjonen i avsnittet «Stabilitet på bearbejdede prøver». I motsatt fall kan det forekomme feilaktige resultater.
12. Sørg for at det telles minst 1 000 Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, siden den automatiske omregningen av resultatene til absolutte tall ellers ikke vil finne sted.
13. Alle loter av Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer inneholder en spesifikk konsentrasjon av fluorofærer. Sørg for at det brukes den korrekte, testede konsentrasjonen ved bestemmelse av resultater for absolutte tall.
14. Preparasjonsmetoder som krever et vasketrinn skal ikke brukes, fordi dette kan føre til ukjent celledap.
15. Bruk av andre inkubasjons- eller blandetider, eller -temperaturer, enn de spesifiserte, kan gi feilaktige resultater.
16. 7-AAD-viabilitetsfargestoffet inneholder 0,005 % 7-AAD. Rent 7-AAD er et potensielt karsinogen. Selv om denne forbindelsen er kraftig fortynnet, anbefaler vi at det unngås at den kommer i kontakt med hud og øyne, og at det brukes egnede verneklær og -hansker og passende øye-/ansiktsvern.
17. 7-AAD-viabilitetsfargestoffet inneholder 1 % dimetylsulfoksid (DMSO). Rent DMSO er lokalirriterende. Selv om denne forbindelsen er fortynnet, anbefaler vi at det unngås at den kommer i kontakt med hud og øyne, og at det brukes egnede verneklær og -hansker og passende øye-/ansiktsvern.
18. Siden 7-AAD er en kromofor, er den lysfølsom. Oppbevar 7-AAD-viabilitetsfargestoffet i pakkens kartongbeholder for å unngå vedvarende eksponering for lys under oppbevaring.
19. Minimer eksponering av blandede prøver for lys under inkubasjonen.
20. Bruk generell god laboratoriepraksis ved håndtering av reagenser.

GHS-FAREKLASSIFISERING

Stem-Count Fluorosferes

FARE



H316

H317

H350

P201

P280

P308+P313

P333+P313

P362+P364

Forårsaker mild hudirritasjon.

Kan utløse en allergisk hudreaksjon.

Kan forårsake kreft.

Innhent særskilt instruks før bruk.

Bruk vernehansker, verneklær og vernebriller/ansiktsskjerm.

VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søk legehjelp.

Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp.

Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt.

Formaldehyd 0,5 - 1,0 %

reaksjonsmasse av:

5-kloro-2-metyl-4-isotiazolin-3-on

[EC# 247-500-7] og

2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EC#

220-239-6] (3:1) < 0,05 %

7-AAD Viabilitetsfargestoff

ADVARSEL

H316

P332+P313

Forårsaker mild hudirritasjon.

Ved hudirritasjon: Søk legehjelp.

Dimetyl Sulfoksyd 0,5 - 2 %



Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på beckman.com/techdocs

OPPBEVARINGSBETINGELSER OG STABILITET

Det uåpnede reagenset er ved oppbevaring mørkt ved 2–8 °C stabilt inntil utløpsdatoen som er påtrykt flasken. Det må ikke brukes etter utløpsdatoen. Må ikke fryses. Stem-Kit-reagenser er stabile i 30 dager etter åpning av flasken med Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer. Åpnede flasker må lukkes straks etter bruk og oppbevares mørkt ved 2–8 °C. Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer må IKKE aliquoterer fra originalflaskene.

VIKTIG: Det er risiko for feilaktige resultater ved lekkasje av Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer. Når Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer har vært åpnet, må de oppbevares stående for å forhindre risiko for lekkasje. Reagensene bør ikke brukes hvis det observeres tegn på lekkasje.

Tegn på nedbryting

Tegn på nedbryting kan forekomme i følgende situasjoner:

Stem-Kit-reagenser unntatt Stem-Count-fluorofærer

- En endring i det normale utseendet som angitt nedenfor

Reagens	Normalt utseende
CD45-FITC / CD34-PE	Klar, lett lyserød væske
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Klar til lett lyserød væske
7-AAD Viabilitetsfargestoff	Klar, lett rosa til rødaktig væske
NH ₄ CL-lyseringsløsning	Klar, fargeløs væske

Stem-Count Fluorosferes

- Fremkomsten, under tellingen, av sekundære fluorescerende populasjoner inneholdende mer enn 20 % av den totale populasjonen av fluorofærer.
- En vesentlig variasjon i verdier oppnådd for tellinger av prøver.

VIKTIG: Reagensene bør ikke brukes hvis det er tegn på nedbryting, siden det i så fall kan oppnås feilaktige resultater. Kontakt den lokale Beckman Coulter-representanten hvis det er tegn på nedbryting.

Klargjøring av reagenser

1. De tofargede reagensene CD45-FITC / CD34-PE og CD45-FITC / IsoClonic Control-PE brukes direkte fra flaskene uten fortykning.
2. Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer brukes direkte fra flaskene uten fortykning. Hele aluminiumsfolien fra varmemerkingen må fjernes fra toppen av flasken når den åpnes første gang. Det er nødvendig å blande grundig. Ved håndtering av flasken med Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer første gang om morgenen må det vortexes i 3–5 sekunder.

Før pipettering fra flasken må den forsiktig vendes på hodet 3–5 gange.

Etter den første vortexblanding om morgenen må flasken med fluorofærer settes i kjøleskap ved 2–8 °C inntil bruk.

Unngå fordamping og lekkasje ved å lukke flaskelokket grundig etter bruk.

3. 7-AAD-viabilitetsfargestoffet brukes direkte fra flasken uten fortykning.
4. Det må daglig fremstilles en 1X NH₄Cl-lyseringsløsning: Tilsett ni volumer deionisert vann til ett volum 10X konsentrert NH₄Cl-lyseringsløsning. Må ikke settes på kjøll. Kasser ubrukt 1X NH₄Cl-lyseringsløsning ved dagens avslutning.

Bring alle reagenser til romtemperatur (18–25 °C) før bruk.

PRØVEHÅNTERING

Krav til prøver

Sammendrag prøvehåndtering:

Prøvematerialetype	Gatingmetode	Oppbevaringstemperatur	Prøvealder
Afarese	Algoritme	2–8 °C	24 timer
	Manuell	2–8 °C	24 timer
Beinmarg	Algoritme	2–8 °C	24 timer
	Manuell	2–8 °C	24 timer
Navlestrengblod	Algoritme	18–25 °C	24 timer
	Manuell	18–25 °C	24 timer
Normalt fullblod	Algoritme	18–25 °C	20 timer
	Manuell	18–25 °C	20 timer
Mobilisert fullblod	Algoritme	18–25 °C	20 timer
	Manuell	18–25 °C	20 timer

1. Biologiske prøver inkluderer friskt, normalt eller mobilisert perifert fullblod og friske eller opptinte afareseprodukter, navlestrengblod og benmarg.
2. Manipulerte eller rensede hematopoietiske progenitorceller (HPC) kan bare analyseres med manuell gating-metode.
3. Hent ut afareseprodukter, prøvemateriale av perifert blod, navlestrengblod eller beinmarg aseptisk i et sterilt evakuert blodtakingsrør med ACD-formel A eller K3 EDTA-antikoagulant.
4. Fullblodprøver og prøver av mobilisert fullblod samlet i antikoagulantrør kan oppbevares i opptil 20 timer i romtemperatur (18–25 °C) før farging.
5. Prøvemateriale fra navlestrengblod samlet i antikoagulantrør kan oppbevares i opptil 24 timer i romtemperatur (18–25 °C) før farging.
6. Innsamlede afareseprodukter og beinmargsprøver kan oppbevares i opptil 24 timer ved 2–8 °C før farging.
7. Før prøveklargjøring må det sikres at konsentrasjonen av hvite blodceller (WBC) ikke er større enn 30 x 10⁹ WBC-celler/L. Om nødvendig fortynnes prøven med HBSS eller tilsvarende for å oppnå en gjennomsnittsverdi på 15 x 10⁹ WBC celler/L. Registrer fortynningsfaktoren med henblikk på beregning av det endelige absolutte HPC-tallet.
8. Lave proteinkonsentrasjoner kan føre til klumping av Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer og gi feilaktig høye resultater for de absolutte celletallene. Fortyning av prøver med en lav proteinkonsentrasjon må derfor utføres ved hjelp av en proteinanrikt buffer.
9. Alle prøver må behandles med Stem-Kit-reagenser medregnet 7-AAD-viabilitetsfargestoffet.

Prosedyre for prøvebehandling

Utfør dobbeltbestemmelser ifølge «The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry» (ISHAGE-retningslinjer for CD34+-cellebestemmelse med flowcytometri) (1).

MERK: Fullstendig veiledning for behandling med Stem-Trol-kontrollceller finnes i pakningsvedlegget for Stem-Trol-kontrollceller hvis den manuelle metoden brukes. Fullstendig veiledning finnes i stemONE System Guide (stemONE-systemveiledningen) levert sammen med stemONE-systemprogramvaren eller stemCXP System Guide (stemCXP-systemveiledningen) levert sammen med stemCXP-systemprogramvaren hvis den automatiske analysemetoden brukes.

1. For hver prøve merkes tre prøverør som følger:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipetter 20 µL CD45-FITC / CD34-PE-reagens ned i prøverørene: 45/34/7-AAD #1 og 45/34/7-AAD #2.
3. Pipetter 20 µL CD45-FITC / IsoClonic kontroll-PE-reagens ned i prøverøret: 45/CTRL/7-AAD.
4. Pipetter 20 µL 7-AAD-viabilitetsfargestoffet ned i alle prøverørene.

VIKTIG: Det er risiko for ufullstendig lysering av blodet hvis prøven henger fast i toppen eller på siden av prøverøret. Vær omhyggelig under pipetteringen, så blodprøven pipetteres ned i bunnen av prøverøret. Rens om nødvendig prøverøret med en vattpinne for å fjerne alle spor av blodprøven fra toppen eller siden av prøverøret.

5. Ved hjelp av en fortrenningspipette eller en repeterpipette pipetteres 100 µL av pasientprøven ned i prøverøret.
6. Prøverøret vortexes straks i 5 sekunder.
7. Alle prøverørene inkuberes i mørke ved romtemperatur (18–25 °C) i 20 minutter.
8. Etter inkubasjonen tilsettes 2 mL klargjort 1X NH₄Cl-lyseringsløsning til hvert prøverør, og det vortexes straks i 5 sekunder.

MERK: Se avsnitt 7.2 ovenfor, med tittelen KLARGJØRING AV REAGENS, for detaljer om klargjøring av lyseringsløsningen.

VIKTIG: Det er risiko for feilaktige resultater hvis det pipetteres luftbobler. Ved for kraftig blanding av Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer kan det dannes luftbobler. Ikke bland Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer for kraftig, og ikke pipetter luftbobler ned i prøveprøverørene.

9. Inkuber i mørke ved romtemperatur i 10 minutter.
10. Bland forsiktig Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer ved å vende flaskene 3 til 5 ganger før bruk.
11. Før innsamling, og rett etter trinn 9, pipetteres 100 µL Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer ned i hvert av de tre prøveprøverørene ved hjelp av en positiv fortrenningspipette eller en repeterpipette.
12. Vortex straks hvert prøverør i 5 sekunder.

MERK: Se avsnitt 7.2 ovenfor, med tittelen KLARGJØRING AV REAGENS, for detaljer om klargjøring av lyseringsløsningen.

Sammendrag over farging av prøver

Reagenser/prøver	45/34/7-AAD #1	Prøverøretikett 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD	20 µL	20 µL	20 µL
Viabilitetsfargestoff			
Prøve	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex – Inkuber ved romtemperatur i 20 minutter. Beskytt dem mot lys.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vortex – Inkuber ved romtemperatur i 10 minutter. Beskytt dem mot lys.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Vorteks			

Reagenser/prøver	45/34/7-AAD #1	Prøverøretikett 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
Når det gjelder innsamlede afereseprodukter, prøver av navlestrengblod og beinmarg, skal du ikke oppbevare prøvene i mer enn 60 minutter på is før innsamling.			
Når det gjelder fullblodprøver og prøver av mobilisert fullblod, skal du ikke oppbevare prøvene i mer enn 45 minutter på is før innsamling.			
Analyser den tinte prøven umiddelbart.			
Må beskyttes fra lys			

Stabilitet på bearbeidet prøve:

- Når det gjelder innsamlede afereseprodukter, prøver av navlestrengblod og beinmarg, skal du etter tilsetning av Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer ikke oppbevare prøvene i mer enn 60 minutter på is før innsamling.
- Fullblodprøver og prøver av mobilisert fullblod skal etter tilsetning av Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer, ikke oppbevares på is i mer enn 45 minutter før innsamling.
- Innsamling av frossen prøve skal gjøres umiddelbart etter tilsetning av Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer.
- Bearbeidede prøver skal oppbevares på is beskyttet mot lys, RT-eksponeringen skal begrenses så mye som mulig under innsamlingen.

INNHold

Natriumazid kan danne eksplosive blandinger i metalliske avløpsrør. Se NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Fare for eksplosive azider) (16.8.76).

For å unngå mulig opphopning av azidforbindelser må avløpsrør skylles med vann etter avhending av uforynnnet reagens. Avfallshåndtering av natriumazid må skje i samsvar med relevante lokale forskrifter.

NØDVENDIGE MATERIALER SOM IKKE FØLGER MED SETTET:

- Deionisert vann.
- Hanks balanserte saltløsning (HBSS) eller tilsvarende
- Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
- Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
- Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
- CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
- QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
- Som alternativ til Stem-Count-fluorofærer: Flow-Count-fluorofærer (REF 7547053)
- Isvannbad
- Plastprøverør (12 x 75 mm)
- Kalibrert repeterpipette (20 µL, 100 µL, 2 mL) og spisser eller kalibrert fortrenningspipette (20 µL, 100 µL, 2 mL) og spisser
- Kalibrert repeterpipette (20 µL, 100 µL, 2 mL) og spisser.
- Vortexblander.
- Timer.
- Flytcytometer.
- stemCXP 2.0 programvarepakke, stemCXP-versjon 2.0, WIN 7, KUN til automatisk analyse av prøver på FC 500 flowcytometersystem med CXP-programvare (versjon 2.0).

RESULTATER

Oppsett av analyseprotokoll

Flowcytometeret må være utstyrt for å detektere fremadspredning, sidespredning og fire fluorescenskanaler. Til FL3-kanalen brukes (til måling av Stem-Count- eller Flow-Count-fluorofærer) et båndpassfilter på 620 nm. Til FL4-kanalen brukes (til måling av 7-AAD-viabilitetsfargestoffet) et båndpassfilter på 675 nm.

Sørg for at flowcytometeret er korrekt justert og standardisert til fluorescensintensitet.

Sørg for at flowcytometeret er korrekt justert for fluorescenskompensasjon.

MERK: For prøveanalyse er alle regionposisjoner tilnærmet inntil avslutningen av tellingen av 45/34/7-AAD #1-prøverøret. Regionene optimeres ifølge nedenstående protokoll og justeres deretter IKKE for det andre og tredje prøverøret i panelet.

Det må følges en serie på 8 histogrammer og gatingskjema til prøveanalyse (se nedenfor). Den samme serien på 8 histogrammer og gatingskjema må følges ved hjelp av CD34+-kontrollceller. Region A, B, C og D (definisjon av region finnes under overskriften «Opprettelse av regioner») må tilpasses til å inkludere den karakteristiske klyngen for CD34+-kontrollcellene.

Opprettelse av histogrammer

Opprett histogrammer som følger:

1. Opprett Histogram 1 som FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter.
2. Opprett Histogram 2 som FL2 CD34-PE vs. Side Scatter.
3. Opprett Histogram 3 som FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter.
4. Opprett Histogram 4 som Forward Scatter vs. Side Scatter.
5. Opprett Histogram 5 som FL1 CD45-FITC vs. FL2 CD34-PE.
6. Opprett Histogram 6 som Forward Scatter vs. Side Scatter.
7. Opprett Histogram 7 som Time vs. FL3 Stem-Count- eller Flow-Count fluorosfærer.
8. Opprett Histogram 8 som FL4 7-AAD Viability Dye vs. Side Scatter.

Histogram 1–4 er beregnet på å karakterisere CD34+ HPC, en prosess som kan utsettes til analysetrinnet. Disse fire første histogrammene settes opp ifølge «The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry» (ISHAGE-retningslinjer for CD34+-cellebestemmelse med flowcytometri) (1, 2). Histogram 5–7 er beregnet på å måle parametere som er viktige under telletrinnet. Disse inkluderer diskriminatoren for fremadspredning, antallet CD45+-hendelser som skal telles, og den korrekte akkumulasjon av fluorosfære-singletter.

Histogram 8 er beregnet på å skjelne mellom og analysere levende hendelser fra døde hendelser.

Opprettelse av regioner

Opprett regioner som følger:

1. Histogram 1 – Opprett en rettlinjert Region A på Histogram 1, så den inneholder alle CD45+-leukocytter og eliminerer trombocytter, avfall fra røde blodceller samt aggregater.
2. Histogram 1 – Opprett en amorf Region E på Histogram 1, så den inneholder lymfocytene (lys CD45, liten sidespredning).
3. Histogram 2 – Opprett en rettlinjert Region B på Histogram 2, så den inneholder alle CD34+-hendelser. Still inn en stopptelling på 75 000 hendelser (CD45+-hendelser) for Histogram 2.
4. Histogram 3 – Opprett en amorf Region C på Histogram 3, så den inneholder alle klyngesamlede CD45dim-hendelser.
5. Histogram 4 – Opprett en amorf Region D på Histogram 4, så den inneholder alle klyngesamlede hendelser med intermediær sidespredning og intermediær til høy fremadspredning.
6. Histogram 5 – Opprett en Quadstat Region I på Histogram 5 for å bekrefte den nedre grense for CD45-ekspresjon på CD34⁺-hendelser.
7. Histogram 5 – Opprett en amorf Region H på Histogram 5, så den omslutter alle Stem-Count- eller Flow-Count-fluorosfærer medregnet dubletter. Region H skal befinne seg i det øverste høyre hjørne av Histogram 5.

MERK: Sørg for at Region H tegnes som en AMORF region.

8. Histogram 5 – Opprett en rettlinjert Region K (betegnet «listgate -») på Histogram 5. Sett grensene for Region K ved første titalls-log for toparameterhistogrammet. Denne Region K tillater eliminering av dobbeltnegative hendelser under tellingen med henblikk på å analysere 75 000 relevante CD45+-hendelser.
9. Histogram 6 – Kopier Region D fra Histogram 4 som Region F i Histogram 6.
10. Histogram 7 – Opprett en rettlinjert Region G på Histogram 7, så den utelukkende inneholder Stem-Count-fluorosfærer- eller Flow-Count-fluorosfærer-singletter. Region G kan merkes som «CAL», så den tillater automatisk beregning av det absolutte tallet for CD34+ HPC (ytterligere detaljer finnes i instrumenthåndboken).
11. Histogram 8 – Opprett en rettlinjert Region J på Histogram 8, så den inneholder levende leukocytter (negative for 7-AAD-viabilitetsfargestoffet).

Opprettelse av gates

Opprett gates som følger:

1. Histogram 1 – Tildel «J» til Histogram 1, så det viser alle levende hendelser. Hvis 7-AAD ikke brukes, tildeles «-H»-region til Histogram 1, så det viser alle hendelser unntatt alle Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer medregnet dubletter.
2. Histogram 2 – Tildel «AJ» («A» hvis 7-AAD ikke brukes) til Histogram 2, så det viser levende (totale hvis 7-AAD ikke brukes) CD34+-hendelser.
3. Histogram 3 – Tildel «A» og «B» og «J» («A» og «B» hvis 7-AAD ikke brukes) til Histogram 3, så det viser alle levende (totale hvis 7-AAD ikke brukes) CD45+ / CD34+-hendelser.
4. Histogram 4 – Tildel «A» og «B» og «C» og «J» («A» og «B» og «C» hvis 7-AAD ikke brukes) til Histogram 4, så det viser levende (totale hvis 7-AAD ikke brukes) CD45+/CD34+-klyngesamlede hendelser med liten sidespredning, mens det utelukker trombocytter og smuss. Hendelser fra Region ABCDJ er virkelige, levende CD34+HPC.
5. Histogram 5 – ungated, så det viser alle hendelser.
6. Histogram 6 – Tildel «EJ» («E» hvis 7-AAD ikke brukes) til Histogram 6, så det viser levende (totale hvis 7-AAD ikke brukes) lymfocytter som en visuell kontroll av diskriminatoren.
7. Histogram 7 – Tildel «H» til Histogram 7, så det viser alle Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer medregnet dubletter.
8. Histogram 8 – Tildel «A» til Histogram 8, så det viser CD45+-hendelser.

Innstilling av flowcytometer

1. Kontroller at flowcytometeret er korrekt innstilt og optimert for lysspredning og fluorescensintensiteter for FL1-, FL2-, FL3- og FL4-detektorene ifølge produsentens og laboratoriets veiledning. Kontroller at fargekompensasjonen er stilt inn for standarddrift. Ytterligere veiledning finnes i instrumenthåndboken.
2. Vortex prøveprøverørerne i 5 sekunder.
3. Utfør telling på flowcytometeret. Det skal analyseres minst 75 000 CD45+-hendelser.
4. For prøveanalyse: Juster diskriminatoren og regionene ved å analysere prøverøret merket 45/34/7-AAD #1. Lagre protokollen og analyser prøverørerne merket 45/34/7-AAD #2 og 45/CTRL/7-AAD uten ytterligere justeringer.

Eksempel på analyse

Histogrammene vist i vedlegget (APPENDIX) er vist i stigende tallrekkefølge som vist i protokollen.

Beregning av CD34+ HPC for prøve

Antallet CD34+ HPC beregnes som gjennomsnittet av de statistiske resultatene for region D for de to repliserte prøvene (dvs. 45/34/7-AAD #1 og 45/34/7-AAD #2).

Resultatene for CD34+ HPC betraktes som gyldige hvis resultatene oppnådd for CD45-FITC / IsoClonic Control-PE-reagenset er mindre enn 10 % av resultatene for CD34+ HPC.

1. Ta gjennomsnittet av resultatene oppnådd for 45/34/7-AAD #1- og 45/34/7-AAD #2-prøverørerne for hver prøve (dvs. gjennomsnittet av de utskrevne statistiske resultatene for Region D). Antallet CD34+ HPC kan falle innenfor 10 % av gjennomsnittet for de dupliserte prøvene. Verdien oppnådd med 45/CTRL/7-AAD-kontrollrøret må være mindre enn 10 % av den gjennomsnittlige verdien oppnådd for prøveprøverørerne for at resultatene kan godkjennes

MERK: Hvis gjennomsnittet av det absolutte tallet oppnådd for duplisert CD34+ HPC faller utenfor det aksepterte området (dvs. overskrider det med 10 %), skal det bestemmes om pipetteringen er blitt utført korrekt, spesielt for Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer. Kontroller visuelt flowcytometerets rapporter og kvaliteten på fargingen og lyseringsprosessen i prøveprøverørerne. Kontroller hvordan regiongrensene ble stilt inn.

Hvis verdien for 45/CTRL/7-AAD faller utenfor området for aksepterte verdier (dvs. overskrider 10 % av gjennomsnittet av det absolutte tall oppnådd for dobbeltbestemmelsen), må det bestemmes om pipetteringen er blitt utført korrekt, spesielt for Stem-Count-fluorofærer eller Flow-Count-fluorofærer. Kontroller visuelt flowcytometerets rapporter og kvaliteten på fargingen og lyseringsprosessen i prøveprøverørerne. Kontroller hvordan regiongrensene ble stilt inn.

Om nødvendig gjentas telletrinnet med et BLANK-prøverør etter det første dupliserte prøverøret 45/34/7-AAD #1 og #2 og før 45/CTRL/7-AAD-prøverøret. Om nødvendig gjentas hele prøveklargjøringen med nye prøverør med tilføyelse av BLANK-prøverøret. Tell både den nye og den foregående serien av prøverør. Sammenlign de to resultatene. Kontakt den lokale Beckman Coulter-representanten hvis det er uoverensstemmelser.

2. Hvis prøven er blitt fortynnet, MÅ resultatene oppnådd ovenfor ganges med den relevante fortynningsfaktor (Dil). Det oppnådde sluttresultat er det absolutte CD34+ HPC-tall (celler/ μ L).

$$\text{Absolutte tall for CD34+ HPC (celler/}\mu\text{L)} = \text{Utskrevet resultat for absolutte tall for CD34+ HPC (celler/}\mu\text{L)} \times \text{Dil}$$

3. For afaresepakker kan det totale antallet CD34+ HPC per pakke beregnes ut fra følgende formel:

$$\text{Absolutte tall for CD34+ HPC per pakke} = \text{Absolutte tall for CD34+ HPC (celler/}\mu\text{L)} \times 10^6 \times \text{pakkevolum (L)}$$

Der:

4. For beregning av prosentandelen av CD34+ HPC innenfor CD45+-leukocytter henvises det til følgende formel:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Absolutte tall for CD34+ HPC (celler/}\mu\text{L)} \quad (\text{dvs. utskrevne resultater for region D})}{\text{Absolutte tall for CD45+-leukocytter (celler/}\mu\text{L)} \quad (\text{dvs. utskrevne resultater for region A})} \times 100$$

KVALITETSKONTROLL

Sørg for at flowcytometeret er korrekt justert ifølge produsentens anbefalinger som angitt i instrumenthåndboken. Det er etablert målintensiteter for optimering av lysspredning og innstillinger av fluorescensinstrumentet med henblikk på analyse av prøver farget med de monoklonale antistoffreagensene CD45-FITC / CD34-PE og CD45-FITC / Isoclonic Control-PE-reagenset.

Fluorokromene fluoresceinisotiocyanat (FITC), fykoerytrin (PE) og 7-aminoaktinomycin D-fargestoff (7-AAD) utstråler lys ved forskjellige bølgelengder, men har i noen grad en spektral overlapping som må korrigeres ved elektronisk kompensasjon. Optimale kompensasjonsnivåer kan etableres ved i et dobbeltparameterhistogram å analysere en fullblodsprøve tilført Stem-Trol Control Cells farget med 7-AAD-viabilitetsfargestoffet eller passende kompensasjonsreagenser ved bruk av CXP-programvaren. I denne analysen utføres det justeringer for å sikre at det ikke forekommer farging i dobbeltfargekvadranten med noe individuelt fluorokrom.

7-AAD-viabilitetsfargestoffet (7-aminoaktinomycin D) brukes til å identifisere døde celler ved flowcytometrisk analyse, slik at telling av de levende cellene av interesse er mulig. Fargestoffet opptas av døde celler (lyse hendelser), som deretter utelukkes fra levende celler (negative hendelser) ved gating (se Histogram 8).

Før analyse av prøver må det farges en testet kontroll (Stem-Trol-kontrollceller) for å bekrefte antistoffreaktiviteten.

YTELSE

Ytelsesegenskapene er basert på Stem-Kit-reagenser brukt sammen med et COULTER EPICS XL/ XL-MCL flowcytometer utstyrt med System II-programvare. Eksempler på ytelse på et FC 500 utstyrt med CXP-programvaren finnes i stemCXP System Guide (stemCXP-systemveiledningen).

Forventede verdier for referanseområder

Normale fullblodsprøver (n = 117) ble tatt ut fra en gruppe menn (n = 58) og kvinner (n = 59) med henblikk på å fastsette et normalreferanseområde. Denne studien ble utført på et eksternt evalueringssenter. Det ble utført dobbeltbestemmelser ifølge pakningsvedlegget for Stem-Kit-reagenser. Manuell gating og analyse ble utført for å oppnå verdier for CD45+, CD34+ og % CD34.

Den statistiske analysen tydet på ikke-gaussisk fordeling av de innsamlede dataene. Basert på disse funnene ble det brukt en ikke-parametrisk (robust) metode til å analysere dataene. Det ble oppnådd verdier for CD45+, CD34+ og % CD34. Verdiene er uttrykt som absolutte tall (celler/μL) for CD45+ og CD34+ og prosentandel av det totale antall leukocytter (% CD34) som vist i tabellen nedenfor.

Normalt fullblod: referanseområder

Manuell metode (robust analyse)	n	CD45+ (celler/μL)				CD34+ (celler/μL)				CD34+ (%)			
		Min.	Maks.	Gjenno- msnitt	SD	Min.	Maks.	Gjenno- msnitt	SD	Min.	Maks.	Gjenno- msnitt	SD
Manuell	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Disse verdiene er bare representative. Hvert enkelt laboratorium bør fastsette egne forventede verdier ut fra den lokale populasjon av normaldonorer.

Linearitet

Det ble utført dobbeltbestemmelser av hver av 10 serielle fortynninger av 2 typer prøver: CD34+-tilførtperifert fullblod og friskt mobilisert fullblod. Det ble tatt ut celler i et dynamisk område på fra 0 til 2 000 celler/μL og fra 0 til 150 celler/μL i det lave følsomhetsområdet med henblikk på bestemmelse av CD34+ HPC-konsentrasjoner. Prøvene ble klargjort ifølge pakningsvedlegget for Stem-Kit-reagenser og analysert på et COULTER EPICS XL/XL-MCL flowcytometer. Verdiene er uttrykt som absolutte tall (celler/μL). Resultatene ble analysert ved lineær regresjon for forventede vs. funne absolutte tall for gjennomsnittet av dobbeltbestemmelsene minus endogene CD34+-celler. Se tabellene nedenfor.

Hellingen av regresjonsgrafene gitt av inntegningene av de absolutte CD34+ HPC-tallene viser den matematisk beregnede lineariteten. Dette støttes av minimal potensiell assayskjevhet som tydeliggjort av skjæringen av y-aksen ifølge analysene. De forventede absolutte tallene demonstrerer høy korrelasjon med de funne absolutte tallene.

Resultater for CD34+-tilført fullblod

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Resultater for perifert (mobilisert) blod

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Metodepresisjon (tabeller) (Forventede vs. funne resultater)

Metodepresisjon defineres som graden av overensstemmelse mellom forventede og funne resultater ved både manuelle og automatiske gating- og analysemetoder. Friskt normalt perifert fullblod ble tilført rensede CD34+-celler til et nivå på 1 875 celler/ μ L. Celletallene ble bekreftet på et Malassez-objektglasshemacytometer, og det ble foretatt serielle fortynninger til forskjellige konsentrasjoner. De forventede resultatene er sammenlignet med de funne resultatene for gjennomsnittet av dobbeltbestemmelser ved hjelp av automatisk og manuell gating og analyse for hvert fortynningsnivå. Kontroll av helling og skjæring med ordinaten demonstrerer at det ikke er statistisk forskjell mellom automatisk gating og analyse og de forventede resultatene og heller ikke mellom manuell gating og analyse og de forventede resultatene.

Metodens nøyaktighet - CD34+ (%)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Metodens nøyaktighet - CD34+ absolutte tall (celler / μ L)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Metodens nøyaktighet - totale leukocytter - CD45+ (celler / μ L)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Nøyaktighet ved fremgangsmåten (automatiske vs. manuelle resultater)

Graden av presisjon mellom de automatiske og manuelle metodene for stemONE-systemet ble studert på fire eksterne evalueringssentre ved hjelp av friskt perifert fullblod og friske eller opptinte afareserprøver, prøver av navlestrengblod og benmargprøver. Konfidensintervaller (KI) ble beregnet ved 95 %-grensen.

Prøver av friskt perifert blod (n = 59 fra tre sentre), friske afareserprodukter (n = 51 fra tre sentre), friskt navlestrengblod (n = 29 fra to sentre), frisk benmarg (n = 33 fra to sentre), opptinte afareserprodukter (n = 23 fra ett senter), opptint navlestrengblod (n = 31 fra to sentre) og opptint benmarg (n = 20 fra ett senter) ble klargjort ifølge pakningsvedlegget for Stem-Kit-reagenser og analysert på COULTER EPICS XL/XL-MCL flowcytometere. Det ble utført automatisk og manuell gating og analyse for å oppnå verdier for CD45+, CD34+ og % CD34.

Metodepresisjon (figurer)

Prøver med ferskt perifert fullblod (n = 59)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Prøver med fersk aferese (n = 51)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Prøver med ferskt navlestrengblod (n = 29)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Prøver med fersk benmarg (n = 33)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Prøver med tint aferese (n = 23)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Prøver med tint navlestrengblod (n = 31)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Opptinte prøver av benmarg (n = 20)

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Presisjon

Presisjon mellom laboratorier

Det ble utført studier på ett klinisk laboratorium utført av tre operatører som brukte hvert sitt flowcytometer. Det ble identifisert tre prøver som representerte det dynamiske området for CD34+ (0–2 000 celler/ μ L):

Lavt område:	Friskt, mobilisert perifert blod
Middelområde:	Afareseprodukter
Høyt område:	Afareseprodukter

Disse prøvene ble delt i tre porsjoner, og én aliquot av hvert nivå (lavt, middels, høyt) ble utlevert til hver operatør. Det ble fremstilt prøver (n = 10) fra hver aliquot ifølge pakningsvedlegget for Stem-Kit-reagenser. Hver operatør utførte analyser på et EPICS XL flowcytometer ved hjelp av automatisk og manuell gating og analyse for å oppnå verdier for CD45+, CD34+ og % CD34. Verdiene er uttrykt som prosentandel (%) av det totale leukocytallet og som absolutte tall (celler/ μ L).

Resultatene av presisjonsstudien foretatt ved flere laboratorier er angitt som nivåer i nedenstående tabeller. Verdier oppnådd for absolutte tall for CD45+ og CD34+ og prosentandel for CD34 viste bare liten variasjon som vist ved middelverdiene, standardavvikene og variasjonskoeffisientene for dobbeltbestemmelsene.

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

Presisjon mellom prøver

Prøver som dekket assayets dynamiske område, ble oppnådd ved hjelp av friskt perifert fullblod, frisk benmarg og friskt og opptint afarese- og navlestrengblod fra fire eksterne evalueringssentre. Ti prøver av hver type ble klargjort ifølge pakningsvedlegget for Stem-Kit-reagenser og analysert på COULTER EPICS XL/XL-MCL flowcytometere ved hjelp av manuell gating og analyse for å oppnå verdier for CD45+, CD34+ og % CD34.

Verdiene for CD45+, CD34+ og % CD34 gitt i de neste tabellene demonstrerer at analysemetoden er reproducerbar som vist ved middelverdiene, standardavvikene og variasjonskoeffisientene for disse målingene. Datatabellene vist i vedlegget (APPENDIX) demonstrerer presisjon ved ett laboratorium for assayet.

En grafisk fremstilling finnes i vedlegget (Appendix).

BEGRENSNINGER

Se stemCXP System Guide (Systemveiledning for stemCXP) som leveres med stemCXP-systemprogramvare, for begrensninger når du bruker den automatiserte metoden.

- Fargede og lyserte prøver skal oppbevares på is og analyseres på flytcytometeret i samsvar med informasjonen i avsnittet «Stabilitet på bearbejdede prøver». I motsatt fall kan det forekomme feilaktige resultater.
- Reagensene skal ikke fortynnes, alikvoteres eller dypfryses. Skal bare brukes slik de er pakket.
- Reagensene er utelukkende beregnet på flowcytometri.
- Tin frosne prøver helt for å sikre optimal farging.
- Under følgende betingelser lyseres ikke nødvendigvis alle røde blodceller: tilstedeværelse av kjernebærende røde blodceller, unormal proteinkonsentrasjon eller hemoglobinopati. Dette kan føre til falskt reduserte resultater av % CD34 fordi ulyserte røde blodceller telles som leukocytter. Absolutte tall for CD34+ og CD45+ bør ikke være påvirket.
- Noen pasienter kan utgjøre særlige problemer på grunn av endrede eller et svært lite antall av visse cellulære populasjoner.
- Resultater oppnådd med flowcytometri kan være feilaktige hvis gates stilles inn feil.
- Stem-Kit-reagenser er beregnet på å bruke 7-AAD-viabilitetsfargestoffet til å bestemme levende HPC-celler. Hvis laboratoriet bruker en annen metode til bestemmelse av levende celler, følges alminnelig god laboratoriepraksis og laboratoriets prosedyrer for kvalitetskontroll for å sikre kvaliteten på de rapporterte resultatene.

VAREMERKER

Beckman Coulter, den stiliserte logoen og vare- og servicemerkene til Beckman Coulter som er omtalt her, er varemerker eller registrerte varemerker som tilhører Beckman Coulter, Inc. i USA og andre land.

TILLEGGSINFORMASJON

www.beckmancoulter.com

Symbolforklaring

Symbolordliste er tilgjengelig på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

Stem-Kit Αντιδραστήρια

REF IM3630 50 εξετάσεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Τα αντιδραστήρια Stem-Kit περιλαμβάνουν ένα δίχρωμο φθορίζον αντιδραστήριο (FITC, PE) μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού, έναν δίχρωμο φθορίζοντα (FITC, PE) ισοκλωνικό μάρτυρα ποντικού, ένα αντιδραστήριο μέτρησης απόλυτου αριθμού, ένα αντιδραστήριο βιωσιμότητας κυττάρων και ένα αντιδραστήριο λύσης. Προορίζεται «Για *in vitro* διαγνωστική χρήση» για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση και καταμέτρηση των CD45+ και των ποσοστών των διπλά θετικών πληθυσμών κυττάρων CD45+ CD34+ και των απόλυτων αριθμών σε βιολογικά υλικά δείγματος με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα βιολογικά υλικά δείγματος περιλαμβάνουν φρέσκο φυσιολογικό ή κινητοποιημένο περιφερικό ολικό αίμα και φρέσκα ή αποψυγμένα προϊόντα αιμαφαίρεσης, αίμα ομφάλιου λώρου και μυελό των οστών. Οι μετρήσεις πληθυσμών κυττάρων μπορούν να ληφθούν με τη χρήση είτε αυτοματοποιημένης μεθόδου είτε μη αυτόματης μεθόδου για οριοθέτηση και ανάλυση.

Ανατρέξτε στο παρόν ένθετο συσκευασίας των Stem-Kit Reagents για ολοκληρωμένες οδηγίες, σε περίπτωση που χρησιμοποιείτε τη μη αυτόματη μέθοδο. Ανατρέξτε στο stemCXP System Guide (Οδηγός συστήματος stemCXP) που παρέχεται με το kit λογισμικού stemCXP 2.0 και το stemCXP, έκδοση 2.0, WIN 7, για ολοκληρωμένες οδηγίες, σε περίπτωση που χρησιμοποιείτε την αυτοματοποιημένη μέθοδο.

ΣΥΝΟΨΗ

Αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (HPC)

Τα αντιδραστήρια Stem-Kit έχουν σχεδιαστεί για την ταυτοποίηση των ανθρώπινων αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (HPC) με τη χρήση των εξής κριτηρίων: «Τα πραγματικά κύτταρα CD34+ (α) εκφράζουν το αντιγόνο CD34, (β) εκφράζουν το αντιγόνο CD45 με το χαρακτηριστικό της έντασης χρώσης των βλαστικών κυττάρων (δηλ. είναι εύκολα ανιχνεύσιμα, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα) και (γ) παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά χαμηλής πλάγιας σκέδασης φωτός και χαμηλής έως μεσαίας πρόσθιας σκέδασης φωτός των βλαστικών κυττάρων» (1). Ο αποκλεισμός των νεκρών CD34+ HPC από την καταμέτρηση των βιώσιμων CD34+ HPC επιτυγχάνεται με τη χρήση της χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD (2).

CD34

Το αντιγόνο CD34 είναι μια οικογένεια διαφορικά γλυκοζυλιωμένων διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών απλής αλυσίδας τύπου I (3, 4, 5). Εκφράζεται ουσιαστικά σε όλα τα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων. Οι επίτοποι CD34 έχουν χωριστεί σε τρεις κατηγορίες με βάση την ευαισθησία στη νευραμινιδάση και στη γλυκοπρωτεάση *Pasteurella haemolytica* (6). Το μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) CD34 που χρησιμοποιείται στα αντιδραστήρια Stem-Kit ονομάζεται 581. Αναγνωρίζει συγκεκριμένα έναν επίτοπο κατηγορίας III του μορίου CD34 (7), όπως προσδιορίζεται από πρότυπα ενζυμικής διάσπασης (6, 8). Αυτό το μονοκλωνικό αντίσωμα 581 αντιστοιχίστηκε στο CD34 κατά τη διάρκεια του 5ου συνεδρίου «HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens» (Συνάντηση εργασίας για τα αντιγόνα διαφοροποίησης των ανθρώπινων λευκοκυττάρων) που πραγματοποιήθηκε στη Βοστώνη των ΗΠΑ το 1993 (7).

CD45

Το αντίσωμα CD45 αναγνωρίζει τα μέλη της οικογένειας των λευκοκυτταρικών αντιγόνων CD45 με μοριακά βάρη 180, 190, 210 και 220 kD (9, 10, 11). Είναι επίσης γνωστό ως κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (LCA). Το αντιγόνο CD45 εκφράζεται σε κάθε τύπο αιμοποιητικών κυττάρων εκτός από τα ώριμα ερυθροκύτταρα και τα προγονικά τους κύτταρα (11, 12). Δεν ανιχνεύεται σε διαφοροποιημένο μη αιμοποιητικό ιστό (12, 13, 14, 15). Το CD45 mAb που χρησιμοποιείται στα αντιδραστήρια Stem-Kit ονομάζεται J33. Αντιστοιχίστηκε στο CD45 κατά τη διάρκεια του 3ου συνεδρίου HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Συνάντηση εργασίας για τα αντιγόνα διαφοροποίησης των ανθρώπινων λευκοκυττάρων), που πραγματοποιήθηκε στην Οξφόρδη του Ηνωμένου Βασιλείου το 1986 (16).

7-AAD

Η χρωστική βιωσιμότητας 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) είναι ένα ανάλογο της ακτινομυκίνης D που περιέχει μια υποκατάστατη αμινομάδα στη θέση 7 του χρωμοφόρου. Η χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων κυτοσίνη και γουανίνη του DNA (15). Οι ακτινομυκίνες είναι βιολογικά δραστικές ενώσεις που περιέχουν ένα χρωμοφόρο 2-αμινο-4, 6 διμεθυλοφαινοξαζόνη-3 και δύο κυκλικά πενταπεπτιδία (17). Οι ακτινομυκίνες δημιουργούν σταθερά συμπλέγματα με το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) διπλής έλικας αλλά όχι με το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) διπλής έλικας ούτε με τα υβρίδια RNA-DNA ή με το DNA ή το RNA μονής έλικας (15, 18).

Οι φασματικές ιδιότητες της χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD καθιστούν αυτό το μόριο ιδιαίτερα κατάλληλο για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (17). Η μέγιστη απορρόφηση του συμπλέγματος 7-AAD/DNA εντοπίζεται στην πράσινη περιοχή του φάσματος και συνεπώς είναι κατάλληλη για κυτταρόμετρο που διαθέτει λείζερ ιόντων αργού (μήκος κύματος διέγερσης 488 nm) (15). Το βαθύ ερυθρό φάσμα εκπομπής φθορισμού της χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD (635 έως 675 nm) καθιστά ευκολότερη τη χρήση αυτού του ανιχνευτή σε συνδυασμό με τα συζευγμένα με ισοθειοκυανιούχο φλουορεσκεΐνη (FITC) και φυκοερυθρίνη (PE) αντισώματα, επειδή, σε αντίθεση με το ιωδιούχο προπιδίο (PI), το σύμπλεγμα 7-AAD/DNA παρουσιάζει ελάχιστη φασματική επικάλυψη με τις FITC και PE (17).

Τα αποπτωτικά κύτταρα, τα νεκρωτικά κύτταρα ή/και τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη αποτελούν πηγές παρεμβολών στην ανάλυση των βιώσιμων κυττάρων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα μη βιώσιμα κύτταρα θα πρέπει να αξιολογηθούν και να διαχωριστούν εστιάζοντας στη θετική χρώση 7-AAD, όταν τα βιώσιμα κύτταρα παραμένουν μη κεχωσμένα (αρνητικά) (19).

Συστήματα κυτταρομετρίας ροής

Τα συστήματα κυτταρομετρίας ροής (FC 500) εφαρμόζουν τις αρχές της κυτταρομετρίας ροής για την ανάλυση βιολογικών υλικών δείγματος με σκοπό την ταυτοποίηση διάφορων πληθυσμών κυττάρων που προσδιορίζονται βάσει των ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων και των φθοριοχρωμάτων που χρησιμοποιούνται. Η παρούσα εξέταση χρησιμοποιεί τα συστήματα κυτταρομετρίας ροής FC 500 που διαθέτουν το λογισμικό συστήματος CXP για την ανάλυση δειγμάτων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Αυτή η δοκιμή εξαρτάται από την ικανότητα ενός μονοκλωνικού αντισώματος να δεσμεύεται στην επιφάνεια των κυττάρων που εκφράζουν διακριτούς αντιγονικούς καθοριστές. Το αντιδραστήριο CD45-FITC/CD34-PE των αντιδραστηρίων Stem-Kit είναι ένας συνδυασμός δύο μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού, καθένα από τα οποία είναι συζευγμένο με ένα συγκεκριμένο φθοριοχρώμα και είναι ειδικό για ένα διαφορετικό αντιγόνο κυτταρικής επιφάνειας. Η ειδική χρώση κυτταρικής επιφάνειας επιτυγχάνεται με επώαση εις διπλούν δειγμάτων του ίδιου βιολογικού υλικού δείγματος με το δίχρωμο αντιδραστήριο CD45-FITC/CD34-PE.

Μια πρόσθετη δοκιμή του ίδιου δείγματος υποβάλλεται σε χρώση με το αντιδραστήριο CD45-FITC / IsoClonic Control-PE για τον έλεγχο της μη ειδικής δέσμευσης του μονοκλωνικού αντισώματος CD34-PE. Η χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD, μια χρωστική νουκλεϊκού οξέος που δεσμεύεται σε προσβάσιμα ζεύγη βάσεων (κυτταρικό DNA), χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ των βιώσιμων και των μη βιώσιμων κυττάρων. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε κάθε δείγμα υποβάλλονται σε λύση με παρασκευασμένο διάλυμα λύσης 1X NH₄Cl. Προστίθενται Stem-Count Fluorospheres ή Flow-Count Fluorospheres (το αντιδραστήριο μέτρησης του απόλυτου αριθμού) και τα υπόλοιπα κύτταρα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής. Έλεγχος διαδικασίας και ποιοτικός έλεγχος για την ανάλυση παρέχονται από το όργανο και από τα αντιδραστήρια ποιοτικού ελέγχου δείγματος: Flow-Check Fluorospheres, Flow-Set Fluorospheres, κατάλληλα αντιδραστήρια αντιστάθμισης και Stem-Trol Control Cells.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ

Μια χρονολογική ταξινόμηση των επιστημονικών αναφορών για τα ανθρώπινα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (HPC) υποδεικνύει ότι οι πρώιμες μελέτες βασίστηκαν στους αριθμούς εμπύρηνων κυττάρων για ποσοτικοποίηση. Οι μεταγενέστερες μελέτες που περιλάμβαναν δοκιμασίες σχηματισμού αποικιών (CFU) παρείχαν κατά προσέγγιση υπολογισμούς για τους πληθυσμούς προγονικών κυττάρων. Μετά τις χρονοβόρες δοκιμασίες CFU ακολούθησε η ανακάλυψη του μορίου κυτταρικής επιφάνειας CD34. Το CD34 διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στην επιφάνεια των πρώιμων αιμοποιητικών κυττάρων και των αιμοποιητικών κυττάρων σχηματισμού αποικιών στον μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα (20). Σε αυτό το χρονικό σημείο αναπτύχθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα που στρέφονται ενάντια στο μόριο CD34 και χρησιμοποιήθηκαν στην κυτταρομετρία ροής. Οι προσδιορισμοί των CD34 με κυτταρομετρία ροής είναι πλέον ευρέως αποδεκτοί ως μέσο εκτίμησης των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων και των βλαστικών κυττάρων.

Στον μυελό των οστών των φυσιολογικών ατόμων, το 1 έως 3% των κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CD34 έχουν την ικανότητα να αποκαθιστούν τη μακροχρόνια αιμοποίηση πολλαπλών σειρών (3, 20). Στο περιφερικό αίμα των φυσιολογικών ατόμων, λιγότερο από το 0,1% των κυκλοφορούντων κυττάρων εκφράζει το αντιγόνο CD34 (1, 21). Η χρήση των αντιδραστηρίων Stem-Kit παρέχει μια απλή, γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής για τη μέτρηση των αιμοποιητικών προγονικών και βλαστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα, των προϊόντων λευκαφαίρεσης, του μυελού των οστών και του αίματος ομφάλιου λώρου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

Τα αντιδραστήρια Stem-Kit περιέχουν τα ακόλουθα:

- Αντιδραστήριο CD45-FITC/CD34-PE (45/34) – 1 φιαλίδιο.
- Αντιδραστήριο CD45-FITC / IsoClonic Control-PE (45/CTRL) – 1 φιαλίδιο.
- Σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count – 1 φιαλίδιο.
- Χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD – 1 φιαλίδιο.
- Διάλυμα λύσης 10X NH₄Cl – 2 φιαλίδια.

1. Αυτά τα αντιδραστήρια πρέπει να χρησιμοποιούνται ως σετ, όπως παρέχονται στο kit.

Τα σφαιρίδια φθορισμού Flow-Count, τα οποία είναι ισοδύναμα με τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού, εάν χρησιμοποιείται η συγκεκριμένη προσδιορισμένη συγκέντρωση.

2. Το CD45-FITC/CD34-PE είναι ένα έτοιμο για χρήση δίχρωμο αντιδραστήριο που παρέχεται σε 2,2 mL αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), το οποίο περιέχει 2 mg/mL λευκωματίνης βόειου ορού (BSA) και 0,1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

3. Το CD45-FITC / IsoClonic Control-PE είναι ένα έτοιμο για χρήση δίχρωμο αντιδραστήριο που παρέχεται σε 1,2 mL PBS, το οποίο περιέχει 2 mg/mL BSA και 0,1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Το αντιδραστήριο CD45-FITC / IsoClonic Control-PE είναι ένα μίγμα μη συζευγμένου και συζευγμένου με PE (όμοιου με CD34) μονοκλωνικού αντισώματος 581. Το μίγμα αυτό δρα ως κατάλληλος, ισομορφολογικός μάρτυρας για τον έλεγχο της μη ειδικής δέσμευσης του CD34-PE mAb σε καθένα και σε όλα τα δείγματα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα αντιδραστήρια CD45-FITC/CD34-PE και CD45-FITC / IsoClonic Control-PE δεν πρέπει να διαχωρίζονται. Όταν πραγματοποιούνται οι δοκιμές και οι έλεγχοι, θα πρέπει να επαληθεύεται με προσοχή ότι αμφότερα τα αντιδραστήρια έχουν τον ίδιο αριθμό παρτίδας στην ετικέτα φιαλιδίου.

Περίληψη χαρακτηριστικών αντισωμάτων

Ειδικότητα	CD45	CD34
Κλώνος	J33	581
Υβρίδωμα	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Ανοσογόνο	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Αλυσίδα Ig	IgG1, ελαφριές αλυσίδες κ	IgG1, ελαφριές αλυσίδες κ
Είδος	Mus	Mus
Σύζευξη	Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC)	R-φυκοερυθρίνη (PE)
Γραμμομοριακή αναλογία	5–8 γραμμομόρια FITC/γραμμομόριο Ig	0,5–1,5 γραμμομόρια PE/γραμμομόριο Ig
Μήκος Κύματος διέγερσης	488 nM (μπλε-πράσινο)	488 nM (μπλε-πράσινο)
Εκπομπή φθορισμού	504 έως 541 nm (κυρίως πράσινο)	568 έως 590 nm (κυρίως πορτοκαλί)

4. Τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count αποτελούνται από φθορίζοντα μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου 10 μm (ονομαστική διάμετρος) σε υδατικό μέσο εναιώρησης 20 mL, που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα και 1% φορμαλδεΰδη. Κάθε σφαιρίδιο περιέχει μια χρωστική με φάσμα εκπομπής φθορισμού από τα 525 nm μέχρι τα 700 nm μετά από διέγερση στα 488 nm. Η προσδιορισμένη συγκέντρωση των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count (σφαιρίδια φθορισμού/μL) προκύπτει από πολλαπλές επαναληπτικές αναλύσεις με τη χρήση ενός αναλυτή μεγέθους σωματιδίων COULTER. Η συγκεκριμένη ανά παρτίδα τιμή αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου.
5. Η χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD παρέχεται σε 99% αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS: 0,01 M φωσφορικό νάτριο, 0,145 M χλωριούχο νάτριο, pH 7,2), με 1% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).
6. Το διάλυμα λύσης NH₄Cl παρέχεται ως συμπυκνωμένο διάλυμα 10X, 20 mL. Περιέχει ένα μίγμα χλωριούχου αμμωνίου (NH₄Cl), διττανθρακικού καλίου (KHCO₃), δινατρίου αλάτος του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA).

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Τα παρασκευάσματα μονοκλωνικού αντισώματος περιέχουν 0,1% αζίδιο του νατρίου. Υπό όξινες συνθήκες, το αζίδιο του νατρίου παράγει υδραζωτικό οξύ, μια εξαιρετικά τοξική ένωση. Η απόρριψη στα αποχετευτικά συστήματα θα πρέπει να συνοδεύεται από έκπλυση με μεγάλη ποσότητα τρεχούμενου νερού για την αποφυγή της επικίνδυνης συσσώρευσης στις μεταλλικές σωληνώσεις και των πιθανών εκρήξεων.
- Μεταχειριστείτε κάθε δείγμα ή παρασκεύασμα, καθώς και κάθε υλικό που έρχεται σε επαφή με αυτά, ως ουσίες ικανές να μεταδώσουν λοιμώξεις και απαλλαγθείτε από αυτά παίρνοντας τις απαραίτητες προφυλάξεις.
- Ποτέ μην χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα και να αποφεύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων μεμβρανών με τα δείγματα ή τα αντιδραστήρια.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου.
- Τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count περιέχουν 1% φορμαλδεΰδη. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τους οφθαλμούς καθώς η φορμαλδεΰδη μπορεί να προκαλέσει ανεπανόρθωτες επιδράσεις σε αυτούς τους ιστούς. Μην εισπνέετε τους ατμούς. Να φοράτε κατάλληλα μέσα προστασίας, όπως γάντια και προστατευτικά γυαλιά.
- Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια Stem-Kit σε πηγές ισχυρού φωτός ή θερμότητας κατά τη διάρκεια της φύλαξης ή της χρήσης.
- Αποφεύγετε την εξάτμιση και διαρροή των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count, διαφορετικά μπορεί να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Σφραγίζετε καλά τα φιαλίδια μετά τη χρήση και φυλάσσετε τα σε όρθια θέση.
- Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια φθορισμού έχουν επανεναιωρηθεί πλήρως πριν από τη χρήση. Αποφεύγετε την υπερβολική ανάμιξη ώστε να περιοριστεί ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα. Μην αναρροφάτε φυσαλίδες αέρα, καθώς ενδέχεται να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα.
- Χρησιμοποιείτε μια βαθμονομημένη πιπέτα (θετικού εκτοπίσματος ή επαναληπτική πιπέτα, κατά προτίμηση) για τη μετάγγιση των δειγμάτων και των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count, διαφορετικά ενδέχεται να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα.

10. Χρησιμοποιείτε τις τεχνικές μεταφοράς με πιπέτα που συνιστώνται από τον κατασκευαστή της πιπέτας, ώστε να διασφαλιστεί η ορθή και ακριβής μετάγγιση των δειγμάτων και των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count, διαφορετικά ενδέχεται να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα.
11. Τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε χρώση και λύση πρέπει να φυλάσσονται σε πάγο και να αναλύονται σε κυτταρόμετρο ροής σύμφωνα με τις πληροφορίες στην ενότητα «Σταθερότητα επεξεργασμένου δείγματος», διαφορετικά ενδέχεται να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα.
12. Βεβαιωθείτε ότι έχουν καταμετρηθεί τουλάχιστον 1.000 σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count, διαφορετικά δεν θα πραγματοποιηθεί η αυτόματη μετατροπή των αποτελεσμάτων σε απόλυτους αριθμούς.
13. Κάθε παρτίδα σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count έχει συγκεκριμένη συγκέντρωση σφαιριδίων φθορισμού. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείται η σωστή προσδιορισμένη συγκέντρωση κατά τον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων απόλυτου αριθμού κυττάρων.
14. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέθοδοι προετοιμασίας που να περιλαμβάνουν στάδιο έκπλυσης, λόγω της απώλειας άγνωστου αριθμού κυττάρων.
15. Η χρήση χρόνων επώασης ή ανάμιξης, ή θερμοκρασιών διαφορετικών από τις καθορισμένες, ενδέχεται να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
16. Η χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD περιέχει 0,005% 7-AAD. Η καθαρή 7-AAD συνιστά πιθανό καρκινογόνο. Παρόλο που αυτή η ένωση παρουσιάζει υψηλή αραιώση, συνιστούμε να αποφεύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια και να φοράτε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία και γάντια, καθώς και κατάλληλη συσκευή προστασίας ματιών/προσώπου.
17. Η χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD περιέχει 1% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Το καθαρό DMSO είναι ερεθιστικό. Παρόλο που αυτή η ένωση είναι αραιωμένη, συνιστούμε να αποφεύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια και να φοράτε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία και γάντια, καθώς και κατάλληλο εξοπλισμό προστασίας ματιών/προσώπου.
18. Ως χρωμοφόρο, η 7-AAD είναι ευαίσθητη στο φως. Φυλάσσετε τη χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD μέσα στη χάρτινη συσκευασία του kit για την αποφυγή της συνεχούς έκθεσης στο φως κατά τη διάρκεια της φύλαξης.
19. Ελαχιστοποιήστε την έκθεση των αναμεμιγμένων δειγμάτων στο φως κατά τη διάρκεια της επώασης.
20. Κατά τον χειρισμό αντιδραστηρίων, χρησιμοποιείτε τις συνήθεις ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ GHS

Stem-Count Σφαιρίδια
φθορισμού

Κ'ΙΝΔΥΝΟΣ



H316
H317

Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος.
Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική
δερματική αντίδραση.

H350
P201

Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.
Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες
πριν από τη χρήση.

P280

Να φοράτε προστατευτικά γάντια,
προστατευτικά ενδύματα και μέσα
ατομικής προστασίας για τα μάτια/το
πρόσωπο.

P308+P313

Σε περίπτωση έκθεσης ή πιθανότητας
έκθεσης: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε
γιατρό.

P333+P313

Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του
δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα:
Συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.

P362+P364

Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε
τα πριν τα χρησιμοποιήσετε.
Φορμαλδεΰδη 0,5 - 1,0%
μάζα αντίδρασης από:
5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειαζολιν-3-όνη
[αριθ. ΕΚ 247-500-7] και
2-μεθυλ-4-ισοθειαζολ-3-όνη [αριθ. ΕΚ
220-239-6] (3:1) < 0,05%



Το Φύλλο Δεδομένων Ασφάλειας είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση
beckman.com/techdocs

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΦΥΛΑΞΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Τα μη ανοιγμένα αντιδραστήρια παραμένουν σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο, όταν φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2–8 °C σε σκοτεινό μέρος. Μην χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης. Μην καταψύχετε. Τα αντιδραστήρια Stem-Kit παραμένουν σταθερά για 30 ημέρες μετά το άνοιγμα του φιαλιδίου σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count. Τα ανοιγμένα φιαλίδια πρέπει να επανασφραγίζονται αμέσως μετά τη χρήση και να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2–8 °C σε σκοτεινό μέρος. ΜΗΝ μεταφέρετε κλάσματα σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count από το αρχικό φιαλίδιο.

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ: Υπάρχει κίνδυνος να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα σε περίπτωση διαρροής σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count. Αφού ανοιχθούν, τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count πρέπει να φυλάσσονται σε όρθια θέση για να αποφευχθεί το ενδεχόμενο διαρροής. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν παρατηρήσετε ενδείξεις διαρροής.

Ενδείξεις αλλοίωσης

Ενδείξεις αλλοίωσης μπορεί να παρατηρηθούν στις εξής περιπτώσεις:

Αντιδραστήρια Stem-Kit, εκτός από σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count

- Αλλαγή στη φυσιολογική εμφάνιση, όπως περιγράφεται παρακάτω

Αντιδραστήριο	Φυσιολογική εμφάνιση
CD45-FITC / CD34-PE	Διαυγές, ελαφρώς ροζέ υγρό
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Διαυγές έως ελαφρώς ροζέ υγρό
Χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD	Διαυγές, ελαφρώς ροζέ έως ερυθρωπό υγρό
Διάλυμα λύσης NH ₄ CL	Διαυγές, άχρωμο υγρό

Stem-Count Fluorospheres

- Η εμφάνιση, κατά τη διάρκεια της λήψης, των δευτερευόντων φθοριζόντων πληθυσμών που περιέχουν ποσοστό μεγαλύτερο από το 20% του συνολικού πληθυσμού των σφαιριδίων φθορισμού.
- Σημαντική απόκλιση σε τιμές που ελήφθησαν για αριθμούς κυττάρων ή δείγματα.

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ: Τα αντιδραστήρια δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν υπάρχουν ενδείξεις αλλοίωσης, καθώς ενδέχεται να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Εάν υπάρχουν ενδείξεις αλλοίωσης, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Beckman Coulter.

Προετοιμασία αντιδραστηρίου

- Τα δίχρωμα αντιδραστήρια CD45-FITC/CD34-PE και CD45-FITC / IsoClonic Control-PE χρησιμοποιούνται απευθείας από τα φιαλίδια χωρίς αραίωση.
- Τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count χρησιμοποιούνται απευθείας από το φιαλίδιο χωρίς αραίωση. Πρέπει να αφαιρεθεί ολόκληρο το φύλλο αλουμινίου από τη θερμική σφράγιση στο επάνω μέρος της φιάλης κατά το πρώτο άνοιγμα. Απαιτείται σωστή ανάμιξη. Κατά τον χειρισμό του φιαλιδίου σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count για πρώτη φορά στην αρχή της ημέρας, περιδινήστε για 3–5 δευτερόλεπτα.

Πριν πραγματοποιήσετε μεταφορά από το φιαλίδιο με τη χρήση πιπέτας, ανακινήστε απαλά αναστρέφοντας το φιαλίδιο 3–5 φορές.

Έπειτα από την αρχική περιδίνηση στην αρχή της ημέρας, το φιαλίδιο των σφαιριδίων φθορισμού πρέπει να επανέλθει σε θερμοκρασία 2–8 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Αποφεύγετε την εξάτμιση και διαρροή σφραγίζοντας καλά τα φιαλίδια μετά την χρήση.

- Η χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD χρησιμοποιείται απευθείας από το φιαλίδιο χωρίς να απαιτείται αραίωση.
- Ένα διάλυμα λύσης 1X NH₄Cl πρέπει να παρασκευάζεται σε ημερήσια βάση: προσθέστε εννέα μέρη απιονισμένου νερού σε ένα μέρος συμπυκνωμένου 10X διαλύματος λύσης NH₄Cl. Μην ψύχετε. Απορρίψτε το αχρησιμοποίητο διάλυμα λύσης 1X NH₄Cl στο τέλος της ημέρας.

Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) πριν από τη χρήση.

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Απαιτήσεις ως προς το υλικό δείγματος

Περίληψη χειρισμού υλικών δειγμάτων:

Τύπος υλικού δείγματος	Μέθοδος οριοθέτησης	Θερμοκρασία φύλαξης	Ηλικία υλικού δείγματος
Αιμαφαίρεση	Αλγόριθμος	2–8 °C	24 ώρες
	Μη αυτόματη	2–8 °C	24 ώρες
Μυελός των οστών	Αλγόριθμος	2–8 °C	24 ώρες
	Μη αυτόματη	2–8 °C	24 ώρες
Αίμα ομφάλιου λώρου	Αλγόριθμος	18–25 °C	24 ώρες
	Μη αυτόματη	18–25 °C	24 ώρες
Φυσιολογικό ολικό αίμα	Αλγόριθμος	18–25 °C	20 ώρες
	Μη αυτόματη	18–25 °C	20 ώρες
Κινητοποιημένο ολικό αίμα	Αλγόριθμος	18–25 °C	20 ώρες
	Μη αυτόματη	18–25 °C	20 ώρες

1. Τα βιολογικά υλικά δείγματος περιλαμβάνουν φρέσκο, φυσιολογικό ή κινητοποιημένο περιφερικό ολικό αίμα και φρέσκα ή αποψυγμένα προϊόντα αιμαφαίρεσης, δείγματα αίματος ομφάλιου λώρου και μυελού των οστών.
2. Τα επεξεργασμένα ή κεκαθαρμένα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (HPC) μπορούν να αναλυθούν μόνο με τη μέθοδο μη αυτόματης οριοθέτησης.
3. Συλλέγετε τα προϊόντα αιμαφαίρεσης, τα υλικά δείγματος περιφερικού αίματος, τα υλικά δείγματος αίματος ομφάλιου λώρου ή τα υλικά δείγματος μυελού των οστών με άσηπτη τεχνική σε αποστειρωμένο αερόκενο σωληνάριο συλλογής αίματος με AXN τύπου A ή αντιπηκτικό K3 EDTA.
4. Τα υλικά δείγματος ολικού αίματος και κινητοποιημένου ολικού αίματος που συλλέγονται σε σωληνάρια με αντιπηκτικό μπορούν να φυλάσσονται για έως και 20 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) πριν από τη χρώση.
5. Υλικά δείγματος αίματος ομφάλιου λώρου που συλλέγονται σε σωληνάρια με αντιπηκτικό μπορούν να φυλάσσονται για έως και 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) πριν από τη χρώση.
6. Τα συλλεγόμενα προϊόντα αιμαφαίρεσης και τα υλικά δειγμάτων μυελού των οστών μπορούν να αποθηκευτούν για έως και 24 ώρες στους 2–8 °C πριν από τη χρώση.
7. Πριν από την παρασκευή του δείγματος, βεβαιωθείτε ότι η συγκέντρωση λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) δεν υπερβαίνει τα 30×10^9 WBC/L. Εάν απαιτείται, αραιώστε το δείγμα με HBSS ή αντίστοιχο διάλυμα για να επιτύχετε μια μέση τιμή 15×10^9 WBC/L. Καταγράψτε τον συντελεστή αραιώσης για τον υπολογισμό του τελικού απόλυτου αριθμού HPC.
8. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσουν στη συγκόλληση των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count με αποτέλεσμα να προκύψουν εσφαλμένα υψηλοί απόλυτοι αριθμοί κυττάρων. Η αραιώση των υλικών δείγματος με χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών πρέπει να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος εμπλουτισμένου με πρωτεΐνες.
9. Όλα τα υλικά δείγματος θα πρέπει να υποβληθούν σε επεξεργασία με αντιδραστήρια Stem-Kit, συμπεριλαμβανομένης της χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD.

Διαδικασία για Επεξεργασία Δειγμάτων

Εκτελείτε τις δοκιμές εις διπλούν, ακολουθώντας τις οδηγίες στο «The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry» (Κατευθυντήριες οδηγίες της ISHAGE για τον προσδιορισμό των κυττάρων CD34+ με κυτταρομετρία ροής) (1).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Αναφορικά με την επεξεργασία των κυττάρων-μαρτύρων Stem-Trol, ανατρέξτε στο ένθετο συσκευασίας των κυττάρων-μαρτύρων Stem-Trol για ολοκληρωμένες οδηγίες, σε περίπτωση που χρησιμοποιείτε τη μη αυτόματη μέθοδο. Ανατρέξτε στο stemONE System Guide (Οδηγός συστήματος για το stemONE), που παρέχεται με το λογισμικό συστήματος stemONE, ή στο stemCXP System Guide (Οδηγός συστήματος stemCXP), που παρέχεται με το λογισμικό συστήματος stemCXP, για ολοκληρωμένες οδηγίες σε περίπτωση που χρησιμοποιείτε την αυτοματοποιημένη μέθοδο.

1. Για κάθε υλικό δείγματος, επισημάνετε τρία σωληνάρια ως εξής:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD

- Μεταγγίστε με πιπέτα 20 µL αντιδραστήριου CD45-FITC/CD34-PE σε σωληνάρια: 45/34/7-AAD #1 και 45/34/7-AAD #2.
- Μεταγγίστε με πιπέτα 20 µL αντιδραστήριου CD45-FITC / IsoClonic Control-PE στο σωληνάριο: 45/CTRL/7-AAD.
- Μεταγγίστε με πιπέτα 20 µL χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD σε όλα τα σωληνάρια.

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ: Υπάρχει κίνδυνος ατελούς λύσης εάν το δείγμα αίματος παραμείνει στο άνω ή το πλαϊνό τμήμα του δοκιμαστικού σωληναρίου. Να είστε προσεκτικοί όταν χρησιμοποιείτε την πιπέτα, ώστε το αίμα να μην έρθει σε επαφή με το άνω ή το πλαϊνό τμήμα του δοκιμαστικού σωληναρίου. Καθαρίστε το σωληνάριο με έναν βαμβακοφόρο στειλεό, εάν χρειάζεται, για να αφαιρέσετε όλα τα ίχνη του δείγματος αίματος από το άνω ή το πλαϊνό τμήμα του δοκιμαστικού σωληναρίου.

- Χρησιμοποιώντας πιπέτα θετικού εκτοπίσματος ή επαναληπτική πιπέτα, μεταγγίστε 100 µL δείγματος ασθενούς στο σωληνάριο.
- η) Ανακινήστε αμέσως με vortex τον σωλήνα για 5 δευτερόλεπτα.
- Επώαστε όλα τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) για 20 λεπτά, προστατεύοντας από το φως.
- Μετά την επώαση, προσθέστε 2 mL του παρασκευασμένου διαλύματος λύσης 1X NH₄Cl σε κάθε σωληνάριο και περιδινήστε αμέσως για 5 δευτερόλεπτα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του διαλύματος λύσης, ανατρέξτε στην ενότητα 7.2, παραπάνω, με τίτλο ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ.

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ: Υπάρχει κίνδυνος εσφαλμένων αποτελεσμάτων σε περίπτωση αναρρόφησης φυσαλίδων αέρα. Η υπερβολική ανάμιξη των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count μπορεί να δημιουργήσει φυσαλίδες αέρα. Μην αναμινύετε υπερβολικά τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count και μην μεταφέρετε με την πιπέτα φυσαλίδες αέρα μέσα στα σωληνάρια δείγματος.

- Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, προστατεύοντας από το φως.
- Αναμίξτε με ήπιες κινήσεις τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count αναστρέφοντας το φιαλίδιο 3 έως 5 φορές πριν από τη χρήση.
- Πριν από τη λήψη και αμέσως μετά από το βήμα 9, χρησιμοποιώντας πιπέτα θετικής εκτόπισης ή επαναληπτική πιπέτα, μεταφέρετε 100 µL σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count σε καθένα από τα τρία σωληνάρια.
- Περιδινήστε αμέσως κάθε σωληνάριο επί 5 δευτερόλεπτα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του διαλύματος λύσης, ανατρέξτε στην ενότητα 7.2, παραπάνω, με τίτλο ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ.

Περίληψη χρώσης υλικού δείγματος

Αντιδραστήρια / Δείγματα	45/34/7-AAD #1	Ετικέτα δοκιμαστικού σωληναρίου 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
Χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD	20 µL	20 µL	20 µL
Δείγμα	100 µL	100 µL	100 µL
Περιδινήστε – Επώαστε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστατεύετε από το φως..			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Περιδινήστε – Επώαστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστατεύετε από το φως..			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Περιδίνηση			
Για τα συλλεγόμενα προϊόντα αιμαφαίρεσης, τα δείγματα αίματος ομφάλιου λώρου και τα δείγματα μυελού των οστών, μην περιμένετε περισσότερο από 60 λεπτά με αποθήκευση σε πάγο πριν από τη λήψη.			
Για δείγματα ολικού αίματος και κινητοποιημένου ολικού αίματος, μην περιμένετε περισσότερο από 45 λεπτά με αποθήκευση σε πάγο πριν από τη λήψη.			
Αναλύετε αμέσως τα δείγματα που έχουν αποψυχθεί.			
Να προστατεύεται από το φως			

Σταθερότητα επεξεργασμένου δείγματος:

- Για τα συλλεγόμενα προϊόντα αιμαφαίρεσης, τα δείγματα αίματος ομφάλιου λώρου και τα δείγματα μυελού των οστών, μετά την προσθήκη των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count, μην περιμένετε περισσότερο από 60 λεπτά με αποθήκευση σε πάγο πριν από τη λήψη.
- Για δείγματα ολικού αίματος και κινητοποιημένου ολικού αίματος, μετά την προσθήκη των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count, μην περιμένετε περισσότερο από 45 λεπτά με αποθήκευση σε πάγο πριν από τη λήψη.
- Για κατεψυγμένα δείγματα, η λήψη θα πρέπει να γίνεται αμέσως μετά την προσθήκη των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count.
- Τα επεξεργασμένα δείγματα πρέπει να αποθηκεύονται σε πάγο, προστατευμένα από το φως, και να περιορίζεται όσο το δυνατόν περισσότερο η έκθεση RT κατά τη διάρκεια της λήψης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Το συντηρητικό αζιδίου του νατρίου μπορεί να σχηματίσει εκρηκτικές ενώσεις στους μεταλλικούς αποχετευτικούς αγωγούς. Δείτε το ενημερωτικό δελτίο του NIOSH: Explosive Azide Hazard (Κίνδυνος έκρηξης αζιδίου) (16/8/76)

Για να αποφύγετε την ενδεχόμενη συσσώρευση ενώσεων αζιδίου, να εκπλύνετε τους σωλήνες αποβλήτων με νερό μετά την απόρριψη μη αραιωμένου αντιδραστήριου. Η απόρριψη του αζιδίου του νατρίου πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους αντίστοιχους τοπικούς κανονισμούς.

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ:

1. Απιονισμένο νερό.
2. Ισορροπημένο διάλυμα αλάτων του Hank (HBSS) ή αντίστοιχο
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Εναλλακτικά, αντί των Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
9. Παγόλουτρο
10. Πλαστικά δοκιμαστικά σωληνάρια (12 x 75 mm)
11. Βαθμονομημένη επαναληπτική πιπέτα (20 µL, 100 µL, 2 mL) και ρύγχη ή βαθμονομημένη πιπέτα θετικού εκτοπίσματος (20 µL, 100 µL, 2 mL) και ρύγχη
12. Τυποποιημένες βαθμονομημένες πιπέττες (20 µL, 100 µL, 2 mL) και ρύγχη.
13. Αναδευτήρας τύπου vortex.
14. Χρονόμετρο.
15. Κυτταρόμετρο ροής.
16. Κιτ λογισμικού stemCXP 2.0, stemCXP, έκδοση 2.0, WIN 7, MONO για αυτοματοποιημένη ανάλυση δειγμάτων σε σύστημα κυτταρομετρίας ροής FC 500 που διαθέτει το λογισμικό CXP (Έκδοση 2.0).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ρύθμιση πρωτοκόλλου ανάλυσης

Το κυτταρόμετρο ροής πρέπει να διαθέτει τη δυνατότητα ανίχνευσης πρόσθιας σκέδασης, πλάγιας σκέδασης και τέσσερα κανάλια φθορισμού. Για το κανάλι FL3 (για την παρακολούθηση των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count), χρησιμοποιείτε ένα ζωνοπερατό φίλτρο 620 nm. Για το κανάλι FL4 (για την παρακολούθηση της χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD), χρησιμοποιείτε ένα φίλτρο μακρών κυμάτων 675 nm.

Βεβαιωθείτε ότι το κυτταρόμετρο ροής είναι σωστά ευθυγραμμισμένο και τυποποιημένο για την ένταση φθορισμού.

Εξασφαλίστε ότι το κυτταρόμετρο ροής είναι σωστά προσαρμοσμένο για αντιστάθμιση φθορισμού.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για την ανάλυση υλικών δείγματος, όλες οι θέσεις περιοχών είναι κατά προσέγγιση μέχρι το τέλος της λήψης του σωληναρίου 45/34/7-AAD #1. Οι περιοχές βελτιστοποιούνται σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο και στη συνέχεια ΔΕΝ προσαρμόζονται για το δεύτερο και το τρίτο σωληνάριο της ομάδας αντιδραστηρίων.

Για την ανάλυση υλικών δείγματος πρέπει να χρησιμοποιείται μία σειρά 8 ιστογραμμάτων και ένα σχήμα οριοθέτησης (βλ. παρακάτω). Πρέπει να ακολουθούνται η ίδια σειρά 8 ιστογραμμάτων και το ίδιο σχήμα οριοθέτησης όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα-μάρτυρες CD34+. Οι περιοχές A, B, C και D [βλ. ενότητα «Region Creation» (Δημιουργία περιοχής), για τον ορισμό μιας περιοχής] πρέπει να προσαρμοστούν ώστε να συμπεριληφθεί η ομάδα χαρακτηριστικών των κυττάρων-μαρτύρων CD34+.

Δημιουργία Ιστογράμματος:

Δημιουργήστε ιστογράμματα ως ακολούθως:

1. Δημιουργήστε Ιστόγραμμα 1 ως FL1 CD45-FITC έναντι πλάγιας σκέδασης.
2. Δημιουργήστε Ιστόγραμμα 2 ως FL2 CD34-PE έναντι πλάγιας σκέδασης.
3. Δημιουργήστε Ιστόγραμμα 3 ως FL1 CD45-FITC έναντι πλάγιας σκέδασης.
4. Δημιουργήστε Ιστόγραμμα 4 ως Πρόσθια σκέδαση έναντι πλάγιας σκέδασης.
5. Δημιουργήστε Ιστόγραμμα 5 ως FL1 CD45-FITC έναντι FL2 CD34-PE.
6. Δημιουργήστε Ιστόγραμμα 6 ως Πρόσθια σκέδαση έναντι πλάγιας σκέδασης.
7. Δημιουργήστε Ιστόγραμμα 7 ως Χρόνος έναντι σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count FL3.
8. Δημιουργήστε Ιστόγραμμα 8 ως Χρωστική βιωσιμότητας FL4 7-AAD έναντι πλάγιας σκέδασης.

Τα Ιστογράμματα 1 έως 4 προορίζονται για τον χαρακτηρισμό των CD34+ HPC, μια διαδικασία που μπορεί να καθυστερήσει μέχρι το βήμα της ανάλυσης. Αυτά τα τέσσερα πρώτα ιστογράμματα διαμορφώνονται σύμφωνα με τις οδηγίες στο «The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry» (Κατευθυντήριες οδηγίες της ISHAGE για τον προσδιορισμό των κυττάρων CD34+ με κυτταρομετρία ροής) (1, 2). Τα Ιστογράμματα 5 έως 7 προορίζονται για την παρακολούθηση των παραμέτρων που είναι σημαντικές κατά τη διάρκεια του βήματος λήψης. Σε αυτές περιλαμβάνονται ο διαχωριστής πρόσθιας σκέδασης, ο αριθμός των προς συλλογή συμβάντων CD45+ και η σωστή συσσώρευση μονών σφαιριδίων φθορισμού.

Το Ιστόγραμμα 8 προορίζεται για τη διάκριση των βιώσιμων συμβάντων από τα μη βιώσιμα συμβάντα και την ανάλυσή τους.

Δημιουργία Περιοχής

Δημιουργήστε τις περιοχές ως ακολούθως:

1. Ιστόγραμμα 1 – Δημιουργήστε μια ορθογώνια περιοχή A στο Ιστόγραμμα 1 για να συμπεριλάβετε όλα τα λευκοκύτταρα CD45+ και να αποκλείσετε τα αιμοπετάλια, τα υπολείμματα ερυθρών αιμοσφαιρίων και τα συσσωματώματα.
2. Ιστόγραμμα 1 – Δημιουργήστε μια άμορφη περιοχή E στο Ιστόγραμμα 1 ώστε να συμπεριλάβετε τα λεμφοκύτταρα (φωτεινό CD45, χαμηλή πλάγια σκέδαση).
3. Ιστόγραμμα 2 – Δημιουργήστε μια ορθογώνια περιοχή B στο Ιστόγραμμα 2 για να συμπεριλάβετε όλα τα συμβάντα CD34+. Ορίστε ως αριθμό διακοπής της καταμέτρησης τα 75.000 συμβάντα (συμβάντα CD45+) για το Ιστόγραμμα 2.
4. Ιστόγραμμα 3 – Δημιουργήστε μια άμορφη περιοχή C στο Ιστόγραμμα 3 για να συμπεριλάβετε όλα τα ομαδοποιημένα συμβάντα CD45dim.
5. Ιστόγραμμα 4 – Δημιουργήστε μια άμορφη περιοχή D στο Ιστόγραμμα 4 για να συμπεριλάβετε όλα τα ομαδοποιημένα συμβάντα με μέτρια πλάγια σκέδαση και μέτρια έως υψηλή πρόσθια σκέδαση.
6. Ιστόγραμμα 5 – Δημιουργήστε μια περιοχή τεταρτημόριου I στο Ιστόγραμμα 5 για επαλήθευση του κατώτερου ορίου της έκφρασης του CD45 σε συμβάντα CD34+.
7. Ιστόγραμμα 5 – Δημιουργήστε μια άμορφη περιοχή H στο Ιστόγραμμα 5 για να περιγράψετε όλα τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count, συμπεριλαμβανομένων των διπλών. Η περιοχή H θα πρέπει να βρίσκεται στην άνω δεξιά γωνία του Ιστογράμματος 5.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Διασφαλίστε ότι η περιοχή H έχει σχεδιαστεί ως AMORPHOUS (Άμορφη) περιοχή.

8. Ιστόγραμμα 5 – Δημιουργήστε μια ορθογώνια περιοχή K (με την ονομασία «listgate – ») στο Ιστόγραμμα 5. Καθορίστε τα όρια της περιοχής K στην πρώτη λογαριθμική δεκάδα του ιστογράμματος δύο παραμέτρων. Αυτή η περιοχή K επιτρέπει την εξάλειψη των διπλών αρνητικών συμβάντων κατά τη διάρκεια της λήψης, για την ανάλυση 75.000 σχετικών συμβάντων CD45+.
9. Ιστόγραμμα 6 – Αντιγράψτε την περιοχή D από το Ιστόγραμμα 4 ως περιοχή F στο Ιστόγραμμα 6.

10. Ιστόγραμμα 7 – Δημιουργήστε μια ορθογώνια περιοχή G στο Ιστόγραμμα 7 για να συμπεριλάβετε μόνο τα μονά σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count. Μπορείτε να επισημάνετε την περιοχή G με την ετικέτα «CAL» για να είναι δυνατός ο αυτόματος υπολογισμός των απόλυτων αριθμών των CD34+ HPC (για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του οργάνου).
11. Ιστόγραμμα 8 – Δημιουργήστε μια ορθογώνια περιοχή J στο Ιστόγραμμα 8 για τη συμπερίληψη των βιώσιμων λευκοκυττάρων (αρνητικά συμβάντα χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD).

Δημιουργία Ρύθμισης διόδου

Δημιουργήστε τις οριοθετήσεις ως ακολούθως:

1. Ιστόγραμμα 1 – Αντιστοιχίστε το «J» στο Ιστόγραμμα 1 για προβολή όλων των βιώσιμων συμβάντων. Εάν δεν χρησιμοποιείται 7-AAD, αντιστοιχίστε την περιοχή «-H» στο Ιστόγραμμα 1 για προβολή όλων των συμβάντων με εξαίρεση όλων των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count, συμπεριλαμβανομένων των διπλών.
2. Ιστόγραμμα 2 – Αντιστοιχίστε το «AJ» («A» εάν δεν χρησιμοποιείται 7-AAD) στο Ιστόγραμμα 2 για προβολή των βιώσιμων συμβάντων CD34+ (των συνολικών, εάν δεν χρησιμοποιείται 7-AAD).
3. Ιστόγραμμα 3 – Αντιστοιχίστε το «A» και το «B» και το «J» («A» και «B» εάν δεν χρησιμοποιείται 7-AAD) στο Ιστόγραμμα 3 για προβολή όλων των βιώσιμων συμβάντων CD45+/CD34+ (των συνολικών, εάν δεν χρησιμοποιείται 7-AAD).
4. Ιστόγραμμα 4 – Αντιστοιχίστε το «A» και το «B» και το «C» και το «J» («A» και «B» και «C» εάν δεν χρησιμοποιείται 7-AAD) στο Ιστόγραμμα 4 για προβολή των βιώσιμων ομαδοποιημένων συμβάντων CD45+/CD34+ (των συνολικών, εάν δεν χρησιμοποιείται 7-AAD) με χαμηλή πλάγια σκέδαση εξαιρώντας παράλληλα τα αιμοπετάλια και τα υπολείμματα. Τα συμβάντα από την περιοχή ABCDJ είναι πραγματικά βιώσιμα CD34+HPC.
5. Ιστόγραμμα 5 – Χωρίς οριοθέτηση για εμφάνιση όλων των συμβάντων.
6. Ιστόγραμμα 6 – Αντιστοιχίστε το «EJ» («E» εάν δεν χρησιμοποιείται 7-AAD) στο Ιστόγραμμα 6 για προβολή των βιώσιμων λεμφοκυττάρων (των συνολικών, εάν δεν χρησιμοποιείται 7-AAD) ως οπτικό έλεγχο στον διαχωριστή.
7. Ιστόγραμμα 7 – Αντιστοιχίστε το «H» στο Ιστόγραμμα 7 για προβολή όλων των σφαιριδίων φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count, συμπεριλαμβανομένων των διπλών.
8. Ιστόγραμμα 8 – Αντιστοιχίστε το «A» στο Ιστόγραμμα 8 για προβολή των συμβάντων CD45+.

Ρύθμιση κυτταρομετρίας ροής

1. Επαληθεύστε ότι το κυτταρόμετρο ροής είναι σωστά ευθυγραμμισμένο και βελτιστοποιημένο για τη σκέδαση φωτός και τις εντάσεις φθορισμού των ανιχνευτών FL1, FL2, FL3 και FL4, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του κατασκευαστή και του εργαστηρίου. Επαληθεύστε ότι η αντιστάθμιση χρώματος έχει ρυθμιστεί κατάλληλα για τυπική λειτουργία. Για περαιτέρω οδηγίες, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του οργάνου.
2. Περιδινήστε τα δοκιμαστικά σωληνάρια για 5 δευτερόλεπτα.
3. Πραγματοποιήστε λήψη δεδομένων στο κυτταρόμετρο ροής. Απαιτείται η ανάλυση τουλάχιστον 75.000 συμβάντων CD45+.
4. Για την ανάλυση υλικών δείγματος: προσαρμόστε τον διαχωριστή και τις περιοχές αναλύοντας το σωληνάριο δείγματος 45/34/7-AAD #1. Αποθηκεύστε το πρωτόκολλο και αναλύστε τα σωληνάρια 45/34/7-AAD #2 και 45/CTRL/7-AAD χωρίς περαιτέρω προσαρμογές.

Παράδειγμα Ανάλυσης

Τα ιστογράμματα που περιλαμβάνονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ παρουσιάζονται με αύξουσα σειρά, όπως παρουσιάζονται στο πρωτόκολλο.

Υπολογισμός CD34+ HPC για το υλικό δείγματος

Ο αριθμός των CD34+ HPC υπολογίζεται ως η μέση τιμή των στατιστικών αποτελεσμάτων της περιοχής D για τις δύο επαναλήψεις δείγματος (δηλ. 45/34/7-AAD #1 και 45/34/7-AAD #2).

Τα αποτελέσματα CD34+ HPC θεωρούνται έγκυρα εάν τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί από το αντιδραστήριο CD45-FITC / IsoClonic Control-PE είναι χαμηλότερα από το 10% των αποτελεσμάτων CD34+ HPC.

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από τα σωληνάρια 45/34/7-AAD #1 και 45/34/7-AAD #2 για κάθε υλικό δείγματος (δηλ. μέση τιμή των εκτυπωμένων αποτελεσμάτων στατιστικών στοιχείων της περιοχής D). Ο αριθμός των CD34+ HPC μπορεί να εμπίπτει στο 10% της μέσης τιμής για τα διπλά δείγματα. Η τιμή που λαμβάνεται με το σωληνάριο μάρτυρα 45/CTRL/7-AAD πρέπει να αντιστοιχεί σε ποσοστό χαμηλότερο από το 10% της μέσης τιμής που λαμβάνεται από τα δοκιμαστικά σωληνάρια για την επικύρωση των αποτελεσμάτων.

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ: Εάν η μέση τιμή του απόλυτου αριθμού που ελήφθη για τη διπλή μέτρηση CD34+ HPC είναι εκτός του αποδεκτού εύρους τιμών (δηλ. υπερβαίνει το 10%), εξακριβώστε εάν η μεταφορά με τη χρήση πιπέτας πραγματοποιήθηκε σωστά, ιδίως για τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count. Ελέγξτε οπτικά τις αναφορές του κυτταρόμετρου ροής και τα δοκιμαστικά σωληνάρια ως προς την ποιότητα των διαδικασιών χρώσης και λύσης. Επαληθεύστε τον τρόπο με τον οποίο ορίστηκαν τα όρια της περιοχής.

Εάν η τιμή που λαμβάνεται με το 45/CTRL/7-AAD είναι εκτός του εύρους των αποδεκτών τιμών (δηλ. υπερβαίνει το 10% της μέσης τιμής του απόλυτου αριθμού που λαμβάνεται για το διπλό δείγμα), εξακριβώστε εάν η μεταφορά με τη χρήση πιπέτας πραγματοποιήθηκε σωστά, ιδιαίτερα για τα σφαιρίδια φθορισμού Stem-Count ή Flow-Count. Ελέγξτε οπτικά τις αναφορές του κυτταρόμετρου ροής και τα δοκιμαστικά σωληνάρια ως προς την ποιότητα των διαδικασιών χρώσης και λύσης. Επαληθεύστε τον τρόπο με τον οποίο ορίστηκαν τα όρια της περιοχής.

Εάν απαιτείται, επαναλάβετε το βήμα της λήψης προσθέτοντας ένα σωληνάριο BLANK (Τυφλό) μετά το πρώτο αναπαραχθέν σωληνάριο 45/34/7-AAD #1 και #2 και πριν από το σωληνάριο 45/CTRL/7-AAD. Εάν απαιτείται, επαναλάβετε ολόκληρη τη διαδικασία της παρασκευής με νέα δοκιμαστικά σωληνάρια, προσθέτοντας το σωληνάριο BLANK (Τυφλό). Πραγματοποιήστε λήψη και ανάλυση τόσο της νέας όσο και της προηγούμενης σειράς σωληναρίων. Συγκρίνετε τα δύο αποτελέσματα. Εάν δεν συμφωνούν, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Beckman Coulter.

2. Εάν το δείγμα έχει αραιωθεί, το αποτέλεσμα που ελήφθη παραπάνω ΠΡΕΠΕΙ να πολλαπλασιαστεί με τον κατάλληλο συντελεστή αραιώσης (Dil). Το τελικό αποτέλεσμα που λαμβάνεται είναι ο απόλυτος αριθμός CD34+ HPC (κύτταρα/μL).

Απόλυτος αριθμός CD34+ HPC (κύτταρα/μL) = CD34+ HPC Εκτυπωμένο αποτέλεσμα απόλυτου αριθμού (κύτταρα/μL) x Dil

3. Για τα σετ αιμαφαίρεσης, ο συνολικός αριθμός CD34+ HPC ανά σετ μπορεί να υπολογιστεί από τον παρακάτω τύπο:

CD34+ HPC Συνολικός αριθμός ανά σετ = Απόλυτος αριθμός CD34+ HPC (κύτταρα/μL) x 10 ⁶ x Όγκος σετ (L)

Όπου:

4. Για το ποσοστό των CD34+ HPC στον υπολογισμό της τιμής λευκοκυττάρων CD45+, ανατρέξτε στον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Απόλυτος αριθμός CD34+ HPC (κύτταρα/μL)} \quad (\text{δηλ. αποτελέσματα εκτύπωσης περιοχής D})}{\text{Απόλυτος αριθμός λευκοκυττάρων CD45+ (κύτταρα/μL)} \quad (\text{δηλ. αποτελέσματα εκτύπωσης περιοχής A})} \times 100$$

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Βεβαιωθείτε ότι το κυτταρόμετρο ροής είναι σωστά ευθυγραμμισμένο σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή, όπως παρατίθενται στα εγχειρίδια των οργάνων. Έχουν καθοριστεί τιμές-στόχοι για την ένταση με σκοπό τη βελτιστοποίηση των ρυθμίσεων σκέδασης φωτός και φθορισμού του οργάνου για την ανάλυση δειγμάτων που έχουν υποβληθεί σε χρώση με το αντιδραστήριο μονοκλωνικού αντισώματος CD45-FITC/CD34-PE και το αντιδραστήριο CD45-FITC / Isoclonic Control-PE.

Τα φθοριοχρώματα ισοθιοκυανινούχου φλουορεσκεΐνη (FITC), φυκοερυθρίνη (PE) και η χρωστική 7-αμινο-ακτινομυκίνη D (7-AAD) εκπέμπουν σε διαφορετικά μήκη κύματος, αλλά παρουσιάζουν ορισμένη φασματική επικάλυψη που πρέπει να διορθώνεται με ηλεκτρονική αντιστάθμιση. Τα βέλτιστα επίπεδα αντιστάθμισης μπορούν να καθοριστούν με ανάλυση, σε ιστόγραμμα δύο παραμέτρων, ενός δείγματος ολικού αίματος ενισχυμένου με Stem-Trol Control Cells που έχουν υποβληθεί σε χρώση με τη χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD και κατάλληλα αντιδραστήρια αντιστάθμισης, με χρήση του λογισμικού CXP. Σε αυτήν την ανάλυση πραγματοποιούνται προσαρμογές, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι δεν προκύπτει χρώση στο τεταρτημόριο δύο χρωμάτων με οποιοδήποτε μεμονωμένο φθοριόχρωμα.

Η χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD (7-αμινο-ακτινομυκίνη D) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση μη βιώσιμων κυττάρων με τη χρήση ανάλυσης κυταρομετρίας ροής, ώστε να είναι δυνατή η καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων ενδιαφέροντος. Η χρωστική προσλαμβάνεται από τα νεκρά κύτταρα (φωτεινά συμβάντα), τα οποία εξαιρούνται από τα βιώσιμα κύτταρα (αρνητικά συμβάντα) με οριοθέτηση (βλ. Ιστόγραμμα 8).

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων, ένας προσδιορισμένος μάρτυρας (κύτταρα-μάρτυρες Stem-Trol) θα πρέπει να υποβληθεί σε χρώση για την επαλήθευση της αντιδραστικότητας των αντισωμάτων.

ΑΠΟΔΟΣΗ

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης που παρέχονται βασίζονται στα αντιδραστήρια Stem-Kit που χρησιμοποιούνται με κυτταρόμετρο ροής COULTER EPICS XL/XL-MCL, με λογισμικό System II. Για παραδείγματα απόδοσης ενός FC 500 με λογισμικό CXP, ανατρέξτε στο stemCXP System Guide (Οδηγός συστήματος stemCXP).

Αναμενόμενες τιμές για εύρη τιμών αναφοράς

Συλλέχθηκαν υλικά δείγματος φυσιολογικού ολικού αίματος (n = 117) από έναν πληθυσμό ανδρών (n = 58) και γυναικών (n = 59) για τον προσδιορισμό ενός φυσιολογικού εύρους τιμών αναφοράς. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε εξωτερικό κέντρο αξιολόγησης. Διενεργήθηκαν επαναληπτικές δοκιμές για κάθε υλικό δείγματος σύμφωνα με το ένθετο συσκευασίας των αντιδραστηρίων Stem-Kit. Πραγματοποιήθηκε μη αυτόματη οριοθέτηση και ανάλυση προκειμένου να ληφθούν οι τιμές CD45+, CD34+ και CD34%.

Η στατιστική ανάλυση υποδεικνύει μια μη γκαουσιανή κατανομή των συλλεγμένων δεδομένων. Με βάση αυτά τα ευρήματα, χρησιμοποιήθηκε μια μη παραμετρική (εύρωστη) προσέγγιση για την ανάλυση των δεδομένων. Ελήφθησαν οι τιμές CD45+, CD34+ και CD34%. Οι τιμές εκφράζονται σε όρους απόλυτων αριθμών (κύτταρα/μL) για τα CD45+ και CD34+ και το ποσοστό του συνολικού αριθμού λευκοκυττάρων (CD34%), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Φυσιολογικό ολικό αίμα: εύρη τιμών αναφοράς

Μη αυτόματη μέθοδος (εύρωστη ανάλυση)	n	CD45+ (κύτταρα/μL)				CD34+ (κύτταρα/μL)				CD34+ (%)			
		Ελάχ.	Max.	Μέσος	SD	Ελάχ.	Max.	Μέσος	SD	Ελάχ.	Max.	Μέσος	SD
Μη αυτόματη	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Οι τιμές αυτές παρέχονται αποκλειστικά για ενδεικτικούς σκοπούς. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να ορίσει τις δικές του αναμενόμενες τιμές βάσει του τοπικού πληθυσμού των φυσιολογικών δοτών.

Γραμμικότητα

Πραγματοποιήθηκαν επαναληπτικές μετρήσεις σε καθεμία από τις 10 διαδοχικές αραιώσεις για 2 τύπους δειγμάτων: ενισχυμένο με CD34+ περιφερικό ολικό αίμα και φρέσκο κινητοποιημένο περιφερικό ολικό αίμα. Επιτεύχθηκε ένα δυναμικό εύρος από 0 έως 2.000 κύτταρα/μL και ένα χαμηλού επιπέδου εύρος ευαισθησίας από 0 έως 150 κύτταρα/μL για τις συγκεντρώσεις CD34+ HPC. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το ένθετο συσκευασίας των αντιδραστηρίων Stem-Kit και αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής COULTER EPICS XL/XL-MCL. Οι τιμές εκφράζονται ως απόλυτοι αριθμοί (κύτταρα/μL). Τα αποτελέσματα αναλύονται σε επίπεδο γραμμικών παλινδρομικών αναλύσεων για τους αναμενόμενους έναντι των ανακτημένων απόλυτων αριθμών για τη μέση τιμή των επαναλήψεων μείον τα ενδογενή κύτταρα CD34+. Δείτε τους παρακάτω πίνακες.

Οι κλίσεις των γραμμών παλινδρόμησης που παρέχονται μαζί με τα διαγράμματα για τους συνολικούς απόλυτους αριθμούς CD34+ HPC υποδεικνύουν τη μαθηματική μέτρηση της γραμμικότητας. Αυτή υποστηρίζεται από ελάχιστο πιθανό συστηματικό σφάλμα δοκιμασίας, όπως καταδεικνύεται από τις τεταγμένες επί της αρχής για τις αναλύσεις. Οι αναμενόμενοι απόλυτοι αριθμοί υποδεικνύουν υψηλή συσχέτιση με τους ανακτημένους απόλυτους αριθμούς.

Αποτελέσματα ολικού αίματος με προσθήκη CD34+

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Αποτελέσματα περιφερικού (κινητοποιημένου) αίματος

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Ακρίβεια της μεθόδου (Πίνακες)
(Αναμενόμενα έναντι ανακτημένων αποτελεσμάτων)

Ως ακρίβεια της μεθόδου ορίζεται ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αναμενόμενων και των ανακτημένων αποτελεσμάτων τόσο για τη μη αυτόματη όσο και για την αυτοματοποιημένη μέθοδο οριοθέτησης και ανάλυσης. Το φρέσκο φυσιολογικό περιφερικό ολικό αίμα ενισχύθηκε με κεκαθαυμένα κύτταρα CD34+ σε επίπεδο 1.875 κυττάρων/μL. Οι αριθμοί κυττάρων επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση μιας πλάκας μέτρησης κυττάρων αίματος Malassez και πραγματοποιήθηκε διαδοχική αραιώση σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα αναμενόμενα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα ανακτημένα αποτελέσματα για τη μέση τιμή των διπλών μετρήσεων με τη χρήση αυτοματοποιημένης και μη αυτόματης οριοθέτησης και ανάλυσης για κάθε επίπεδο αραιώσης. Ο έλεγχος κλίσης και συντεταγμένων στο σημείο τομής του άξονα δεν υποδεικνύει την ύπαρξη στατιστικής διαφοράς μεταξύ της αυτοματοποιημένης οριοθέτησης και ανάλυσης και των αναμενόμενων αποτελεσμάτων ή μεταξύ της μη αυτόματης οριοθέτησης και ανάλυσης και των αναμενόμενων αποτελεσμάτων.

Ακρίβεια της μεθόδου - CD34+ (%)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Ακρίβεια της μεθόδου - Απόλυτος αριθμός CD34+ (κύτταρα/μL)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Ακρίβεια της μεθόδου - Συνολικός αριθμός λευκοκυττάρων - CD45+ (κύτταρα/μL)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Ακρίβεια της μεθόδου (αυτοματοποιημένα αποτελέσματα έναντι μη αυτοματοποιημένων αποτελεσμάτων)

Ο βαθμός ακρίβειας μεταξύ της αυτοματοποιημένης και της μη αυτόματης μεθόδου του συστήματος stemONE μελετήθηκε σε τέσσερα εξωτερικά κέντρα αξιολόγησης με τη χρήση φρέσκου περιφερικού ολικού αίματος και φρέσκων ή αποψυγμένων υλικών δείγματος αιμαφαίρεσης, αίματος ομφάλιου λώρου και μυελού των οστών. Τα διαστήματα αξιοπιστίας (CI) υπολογίστηκαν με όρια 95%.

Παρασκευάστηκαν υλικά δείγματος φρέσκου περιφερικού ολικού αίματος (n = 59 από τρία κέντρα), φρέσκων προϊόντων αιμαφαίρεσης (n = 51 από τρία κέντρα), φρέσκου αίματος ομφάλιου λώρου (n = 29 από δύο κέντρα), φρέσκου μυελού των οστών (n = 33 από δύο κέντρα), αποψυγμένων προϊόντων αιμαφαίρεσης (n = 23 από ένα κέντρο), αποψυγμένου αίματος ομφάλιου λώρου (n = 31 από δύο κέντρα) και αποψυγμένου μυελού των οστών (n = 20 από ένα κέντρο) σύμφωνα με το ένθετο συσκευασίας των αντιδραστηρίων Stem-Kit και αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής COULTER EPICS XL/XL-MCL. Πραγματοποιήθηκαν αυτοματοποιημένη και μη αυτόματη οριοθέτηση και ανάλυση προκειμένου να ληφθούν οι τιμές CD45+, CD34+ και CD34%.

Ακρίβεια των μεθόδων (Εικόνες)

Φρέσκα υλικά δείγματος περιφερικού ολικού αίματος (n = 59)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Φρέσκα υλικά δείγματος αιμαφαίρεσης (n = 51)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Φρέσκα υλικά δείγματος αίματος ομφάλιου λώρου (n = 29)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Φρέσκα υλικά δείγματος μυελού των οστών (n = 33)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Αποψυγμένα υλικά δείγματος αιμαφαίρεσης (n = 23)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Αποψυγμένα υλικά δείγματος αίματος ομφάλιου λώρου (n = 31)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Αποψυγμένα υλικά δείγματος μυελού των οστών (n = 20)

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Ακρίβεια

Διεργαστηριακή ακρίβεια

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε μία κλινική μονάδα από τρεις χειριστές, καθένας από τους οποίους χρησιμοποίησε διαφορετικό κυτταρόμετρο ροής. Ταυτοποιήθηκαν τρία υλικά δείγματος που αντιπροσωπεύουν το δυναμικό εύρος CD34+ (0–2.000 κύτταρα/μL):

Χαμηλό εύρος:	φρέσκο, κινητοποιημένο περιφερικό αίμα
Μεσαίο εύρος:	προϊόν αιμαφαίρεσης
Υψηλό εύρος:	προϊόν αιμαφαίρεσης

Αυτά τα υλικά δείγματος έχουν χωριστεί σε τρία κλάσματα. Ένα κλάσμα από κάθε επίπεδο (χαμηλό, μεσαίο, υψηλό) παρασχέθηκε σε καθέναν από τους τρεις χειριστές. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν (n = 10) από κάθε κλάσμα σύμφωνα με το ένθετο συσκευασίας των αντιδραστηρίων Stem-Kit. Κάθε χειριστής εκτέλεσε ανάλυση σε κυτταρόμετρο ροής EPICS XL χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένη και μη αυτόματη οριοθέτηση και ανάλυση για τη λήψη των τιμών CD45+, CD34+ και CD34%. Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστά (%) επί του συνολικού αριθμού λευκοκυττάρων και ως απόλυτοι αριθμοί (κύτταρα/μL).

Τα αποτελέσματα της μελέτης διεργαστηριακής ακρίβειας, ανά επίπεδο, παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες. Στις τιμές που ελήφθησαν για τους απόλυτους αριθμούς CD45+ και CD34+ και τα ποσοστά CD34 παρατηρήθηκε ελάχιστη μεταβλητότητα βάσει των μέσων τιμών, των τυπικών αποκλίσεων και των συντελεστών μεταβλητότητας για τις επαναληπτικές μετρήσεις.

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

Ενδοεργαστηριακή ακρίβεια

Τα υλικά δείγματος που καλύπτουν το δυναμικό εύρος της δοκιμασίας ελήφθησαν με τη χρήση φρέσκου περιφερικού ολικού αίματος, φρέσκου μυελού των οστών και αποψυγμένων προϊόντων αιμαφαίρεσης και αίματος ομφάλιου λώρου από τέσσερα εξωτερικά κέντρα αξιολόγησης. Παρασκευάστηκαν δέκα δείγματα από το καθένα σύμφωνα με το ένθετο συσκευασίας των αντιδραστηρίων Stem-Kit και αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρα ροής COULTER EPICS XL/XL-MCL με τη χρήση μη αυτόματης οριοθέτησης και ανάλυσης για τη λήψη των τιμών CD45+, CD34+ και CD34%.

Οι τιμές για τα CD45+, CD34+ και CD34% που παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν καταδεικνύουν ότι η μέθοδος ανάλυσης είναι αναπαραγώγιμη, όπως αποδεικνύεται βάσει των μέσων τιμών, των τυπικών αποκλίσεων και των συντελεστών μεταβλητότητας για αυτές τις μετρήσεις. Οι πίνακες δεδομένων που παρουσιάζονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ καταδεικνύουν ενδοεργαστηριακή ακρίβεια για τη δοκιμασία.

Βλ. Παράρτημα για διάγραμμα.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Ανατρέξτε στο stemCXP System Guide (Οδηγός συστήματος stemCXP) που παρέχεται με το λογισμικό συστήματος stemCXP, για τους περιορισμούς που ισχύουν όταν χρησιμοποιείτε την αυτοματοποιημένη μέθοδο.

- Τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε χρώση και λύση πρέπει να φυλάσσονται σε πάγο και να αναλύονται σε κυτταρόμετρο ροής σύμφωνα με τις πληροφορίες στην ενότητα «Σταθερότητα επεξεργασμένου δείγματος», διαφορετικά ενδέχεται να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα.
- Μην αραιώνετε, μην επιμερίζετε και μην καταψύχετε τα αντιδραστήρια. Χρησιμοποιείτε τα μόνο όπως παρέχονται στη συσκευασία.
- Τα αντιδραστήρια προορίζονται μόνο για χρήση με κυτταρομετρία ροής.
- Αποψύξτε σωστά τα κατεψυγμένα υλικά δείγματος για να διασφαλίσετε τη βέλτιστη χρώση.
- Όλα τα ερυθρά αιμοσφαίρια ενδέχεται να μην υποστούν λύση υπό τις ακόλουθες συνθήκες: παρουσία εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων, μη φυσιολογική συγκέντρωση πρωτεΐνης ή αιμοσφαιρινοπάθειες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς μειωμένα αποτελέσματα CD34% λόγω των μη λυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων που υπολογίζονται ως λευκοκύτταρα. Οι απόλυτοι αριθμοί CD34+ και CD45+ δεν πρέπει να επηρεαστούν.
- Ορισμένοι ασθενείς ενδέχεται να παρουσιάζουν ειδικά προβλήματα λόγω του τροποποιημένου ή του πολύ χαμηλού αριθμού ορισμένων κυτταρικών πληθυσμών.
- Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με κυτταρομετρία ροής ενδέχεται να είναι εσφαλμένα εάν τα όρια δεν έχουν ρυθμιστεί σωστά.
- Τα αντιδραστήρια Stem-Kit έχουν σχεδιαστεί για χρήση με χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD για τον προσδιορισμό των βιώσιμων κυττάρων HPC. Εάν το εργαστήριό σας χρησιμοποιεί εναλλακτική μέθοδο προσδιορισμού της βιωσιμότητας, ακολουθείτε τις συνήθειες ορθές εργαστηριακές πρακτικές και τις διαδικασίες ελέγχου ποιότητας του εργαστηρίου σας για να διασφαλίζετε την ποιότητα των αναφερόμενων αποτελεσμάτων.

ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ

Η επωνυμία Beckman Coulter, το τυποποιημένο λογότυπο και τα σήματα προϊόντων και υπηρεσιών της Beckman Coulter που αναφέρονται στο παρόν είναι εμπορικά σήματα ή σήματα κατατεθέντα της Beckman Coulter, Inc. στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε άλλες χώρες.

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

www.beckmancoulter.com

Υπόμνημα συμβόλων

Το γλωσσάριο συμβόλων είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση beckman.com/techdocs (αριθμός εγγράφου B60062)

Stem-Kit reagensek

REF IM3630 50 teszt

***In vitro* diagnosztikai használatra.**

RENDELTETÉSSZERŰ HASZNÁLAT

A Stem-Kit reagensek kétszínű fluoreszcens (FITC, PE) egér monoklonális antitest reagenst, kétszínű fluoreszcens (FITC, PE) egér izoklonális kontrollt, egy abszolút sejtszám meghatározására való reagenst, egy vitális festéket és egy lizálóreagenst tartalmaznak. „In vitro diagnosztikai felhasználásra” szolgál a CD45+ és a kétszeresen pozitív CD45+ CD34+ sejtpopuláció egyidejű azonosítására és a százalékos és az abszolút sejtszám megállapítására biológiai mintákban, áramlási citometriával. A biológiai minták közé tartozik a friss normális vagy mobilizált perifériás teljes vér, valamint a friss vagy felolvasztott aferézistermékek, köldökzsinórvér és csontvelő. A sejtpopulációk méréséhez a kapuzás és az elemzés végezhető automatikus módszerrel vagy manuális módszerrel.

A manuális módszer használatához a részletes utasítások megtalálhatók ebben a Stem-Kit Reagents reagensekhez mellékelt terméktájékoztatóban. Az automatikus módszer használata esetén a részletes utasításokat lásd a stemCXP 2.0-s szoftvercsomaghoz, illetve a stemCXP 2.0-s verzióhoz (WIN 7) mellékelt stemCXP System Guide (stemCXP rendszer útmutató) dokumentumban.

ÖSSZEFOGLALÁS

Hemopoetikus progenitor sejtek (HPC)

A Stem-Kit reagensek a humán hemopoetikus progenitor sejtek (HPC) azonosítására szolgálnak a következő feltételek mellett: „A valódi CD34+ sejtek (a.) expresszálják a CD34 antigént, (b.) expresszálják a CD45 antigént, a blasztsejtekre jellemző intenzitással (tehát kimutatható, de a limfocitáknál és a monocitáknál alacsonyabb koncentrációban), és (c.) a blasztsejtekre jellemző alacsony oldalra szóródást és alacsony vagy közepes előre szóródást mutatnak” (1). Az elhalt CD34+ HPC-k és az élő CD34+ HPC-k megkülönböztetése 7-AAD vitális festékekkel történik (2).

CD34

A CD34 antigén különbözően glikozilált, egy fehérjeláncból álló, I-es típusú transzmembrán glikoproteinek családját jelenti (3, 4, 5). Gyakorlatilag minden hemopoetikus prekursor sejten expresszálódik, beleértve a multipotens őssejteket is. A CD34 epitópok három osztályba vannak sorolva a neuraminidázra és a Pasteurella haemolytica glikoproteázra való érzékenyséjük alapján (6). A Stem-Kit reagensekben használt CD34 elleni monoklonális antitest (mAb) elnevezése 581. Ez specifikusan felismeri a CD34 molekula egyik III. osztályú epitópját (7), amelynek meghatározása az enzimek általi hasítási mintázatok alapján történik (6, 8). Ezt az 581 elnevezésű monoklonális antitestet rendelték hozzá a CD34-hez a 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5. humán leukocita-differenciálódási antigén kutatási műhely) alkalmával (Boston, Amerikai Egyesült Államok, 1993) (7).

CD45

A CD45 antitestek felismerik a pánleukocita CD45 antigének családjának 180, 190, 210 és 220 kD molekulatömegű tagjait (9, 10, 11). Ezek közös leukocitaantigén (LCA) néven is ismeretesek. A CD45 antigén minden hemopoetikus sejtípuson kifejeződik, kivéve az érett vörösvértesteket és azok közvetlen progenitorait (11, 12). Nem mutatták ki differenciált, nem hemopoetikus szövetekben (12, 13, 14, 15). A Stem-Kit reagensekben használt CD45 elleni monoklonális antitest elnevezése J33. Ezt rendelték hozzá a CD45-höz a 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3. humán leukocita-differenciálódási antigén kutatási műhely) alkalmával (Oxford, Nagy-Britannia, 1986) (16).

7-AAD

A 7-amino-aktinomicin-D (7-AAD) vitális festék az aktinomicin D analógja, amely a kromofór 7-es pozícióján aminocsoporttal van szubsztituálva. A 7-AAD vitális festék a DNS citozin- és guaninbázisai közé kötődik (15). Az aktinomicinek biológiailag aktív vegyületek, amelyek egy 2-amino-4,6-dimetil-fenoxazon-3 kromofórt és két ciklikus pentapeptidet tartalmaznak (17). Az aktinomicinek stabil komplexet képeznek a kettős szálú dezoxiribonukleinsavval (DNS), de nem kötődnek sem a kettős szálú ribonukleinsavhoz (RNS), sem az RNS-DNS hibridekhez, sem az egyes szálú DNS-hez vagy RNS-hez (15, 18).

A 7-AAD vitális festék spektrális jellemzői ezt a molekulát kifejezetten alkalmassá teszik az áramlási citometriás analízisre (17). A 7-AAD / DNS komplexum maximális fényelnyelése a spektrum zöld területére esik, és ezért alkalmas argonlézerrel (gerjesztési hullámhossza 488 nm) felszerelt citométerrel való használatra (15). A 7-AAD vitális festék sötétvörös (635–675 nm-es) fluoreszcencia-kibocsátása megkönnyíti a használatát fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) és fikoeritrinnel (PE) konjugált antitestekkel, mivel – a propidium-jodiddal (PI) szemben – a 7-AAD / DNS komplexum minimális spektrális átfedést mutat az FITC és a PE festékekkel (17).

Az apoptózist szenvedett, elhalt vagy sérült sejtek zavarhatják az élő sejtek áramlási citometriás vizsgálatát. A nem élő sejtek értékelését és kizárását a 7-AAD-pozitív festődés alapján kell végezni; az élő sejtek nem festődnek (negatív) (19).

Áramlási citométeres rendszerek

Az áramlási citometriás rendszerek (FC 500) biológiai minták analizálására szolgálnak az áramlási citometria elvei alapján, a specifikus monoklonális antitestekkel és fluoreszcens fluorokrómokkal meghatározott különböző sejtpopulációk azonosítása céljából. Ez a vizsgálat minták elemzésére szolgál az FC 500 áramlási citometriás rendszeren futó CXP rendszerszoftverrel.

MŰKÖDÉSI ELV

A teszt sikeressége attól függ, hogy a monoklonális antitest képes-e kötődni a diszkrét antigenikus determinánsokkal rendelkező sejtek felületén. A Stem-Kit reagensek CD45-FITC / CD34-PE reagense két monoklonális egér antitestből áll, amelyek különböző fluorokrómokhoz vannak konjugálva, és különböző sejtfelszíni antigénekre specifikusak. A sejtfelszín specifikus festéséhez a biológiai minta két példányát kell inkubálni a kétszínű CD45-FITC / CD34-PE reagenssel.

Egy további vizsgálatban ugyanannak a mintának a festése történik CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagenssel, a CD34-PE monoklonális antitesthez való nem specifikus kötődés ellenőrzéséhez. Az élő és a nem élő sejtek megkülönböztetése a nukleinsavak festésére szolgáló 7-AAD vitális festékekkel történik, amely kötődik a hozzáférhető bázispárokhöz (a sejt DNS-ében). Minden mintában a vörösvértestek lizálása 1-szeres töménységben elkészített NH₄Cl lizálóoldattal történik. A Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök (az abszolút sejtszám meghatározására szolgáló reagens) hozzáadása után a megmaradt sejteket jellemezni lehet áramlási citometriás módszerrel. A vizsgálathoz a folyamat ellenőrzése és a minőség-ellenőrzés a berendezéssel és az alábbi minőség-ellenőrzési reagenssekkel történik: Flow-Check fluorogömbök, Flow-Set fluorogömbök, megfelelő kompenzációs reagensek, valamint Stem-Trol Control Cells kontrollsejtek.

PÉLDÁK KLINIKAI ALKALMAZÁSRA

A hemopoetikus progenitor sejtekkel (HPC) kapcsolatos tudományos vizsgálatok időbeli áttekintése azt mutatja, hogy a korai vizsgálatokban a mennyiségi meghatározáshoz a sejtmaggal rendelkező sejtek számlálását végezték. A későbbi vizsgálatokban a kolóniaképző egységek (CFU) vizsgálatával becsülték meg a progenitor sejtek hozzávetőleges mennyiségét. Az időigényes CFU-vizsgálatokat követte a CD34 sejtfelszíni molekula felfedezése. Megállapították, hogy a CD34 jelen van a korai hemopoetikus sejtek és a hemopoetikus kolóniaképző sejtek felszínén a csontvelőben és a perifériás vérben (20). Ezután kifejlesztettek a CD34 molekula elleni monoklonális antitesteket, és ezeket használták áramlásos citometriával. Ma a hemopoetikus progenitor sejtek és őssejtek kimutatásának széles körben elfogadott módszere a CD34 áramlási citometriával való meghatározása.

Egészséges személyek csontvelőjében a CD34 antigént expresszáló sejtek 1–3%-a képes a tartós, sok sejtvonalat tartalmazó vérképzés helyreállítására (3, 20). Egészséges személyek perifériás vérében a sejtek kevesebb mint 0,1%-a expresszálja a CD34 antigént (1, 21). A Stem-Kit reagensek használata egyszerű, gyors és érzékeny áramlási citometriás módszer a hemopoetikus progenitor sejtek és őssejtek megszámlálására perifériás vérben, leukoferézissel nyert mintában, csontvelőben vagy köldökzsínórvérben.

REAGENS TARTALMA

A Stem-Kit reagensek termék a következő reagenseket tartalmazza:

- CD45-FITC / CD34-PE reagens (45/34) – 1 üveg.
- CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagens (45/CTRL) – 1 üveg.
- Stem-Count fluorogömbök – 1 üveg.
- 7-AAD vitális festék – 1 üveg.
- 10-szeres töménységű NH₄Cl lizálóoldat – 2 üveg.

1. Ezeket a reagenseket egy készletként kell használni, ahogyan azokat szállítják a készletben.

A Flow-Count fluorogömbök, amelyek egyenértékűek a Stem-Count fluorogömbökkel, a specifikus vizsgálati koncentrációban alkalmazva az abszolút sejtszámok meghatározására használhatók.

2. A CD45-FITC / CD34-PE felhasználásra kész kétszínű reagens 2,2 mL foszfátpufferes sóoldatban (PBS), amely tartalmaz 2 mg/mL szarvasmarha-szérumalbumint (BSA) és tartósítószerként 0,1% nátrium-azidot.
3. A CD45-FITC / IsoClonic Control-PE felhasználásra kész kétszínű reagens 1,2 mL PBS-ben, amely tartalmaz 2 mg/mL BSA-t és tartósítószerként 0,1% nátrium-azidot. A CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagens nem konjugált és PE-vel (megegyezik a CD34-gyel) konjugált 581-es monoklonális antitestek keveréke. Ez a keverék megfelelő, izomorf kontrollként működik a CD34-PE monoklonális antitest nem specifikus kötődésének ellenőrzésére minden minta esetén.

MEGJEGYZÉS: A CD45-FITC / CD34-PE és CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagenseket nem szabad egymástól elválasztva használni. A vizsgálatok és a kontrollok mérésekor figyelni kell, hogy azonos legyen a két reagens üvegén feltüntetett tételszám.

Az antitestek jellemzői

Specifititás	CD45	CD34
Klón	J33	581
Hibridóma	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogén	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig lánc	IgG1, κ könnyűláncok	IgG1, κ könnyűláncok
Faj	Egér	Egér
Konjugáció	Fluoreszcein-izotiocianát (FITC)	R fikoeritrin (PE)

Specificitás	CD45	CD34
Moláris arány	5–8 mol FITC/mol Ig	0,5–1,5 mol PE/mol Ig
Gerjesztési hullámhossz	488 nm (kékeszöld)	488 nm (kékeszöld)
Fluoreszcenciakibocsátás	534–541 nm (főleg zöld)	568–590 nm (főleg narancsszínű)

- A Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök 10 µm-es (névleges átmérőjű) fluoreszcens polisztiREN mikrogömbök 20 mL vizes szuszpenzióban, amely felületaktív anyagot és 1% formaldehidet tartalmaz. Minden fluorogömb festékanyagot tartalmaz, amelynek a fluoreszcenciaemissziós tartománya 525 nm és 700 nm között van 488 nm-es gerjesztés esetén. A Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök mért koncentrációja (fluorogömb/µL) többször ismételt, COULTER részecskeméret-analizátorral végzett mérésből származik. A tételspecifikus érték az üveg címkéjén van feltüntetve.
- A 7-AAD vitális festék 99% foszfátpufferes sóoldat (PBS: 0,01 M nátrium-foszfát, 0,145 M nátrium-klorid, pH 7,2) és 1% dimetil-szulfoxid (DMSO) keverékében van kisserelve.
- Az NH₄Cl lizálóoldat 20 mL 10-szeres töménységű oldatként van kisserelve. Ammónium-kloridot (NH₄Cl), kálium-bikarbonátot (KHCO₃) és dinátrium-etiléndiamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmaz.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

- A monoklonális antitest készítmények 0,1% nátrium-azidot tartalmaznak. A nátrium-azid savas közegben nitrogén-hidrogénsavat képez, amely rendkívül mérgező vegyület. A szennyvízbe való kiöntése után nagy mennyiségű folyó vízzel le kell öblíteni, hogy ne történhessen veszélyes mértékű felhalmozódása a fémcsövekben, és esetleges robbanás.
- A mintákat, klinikai mintákat és minden, velük érintkezésbe kerülő anyagot potenciálisan fertőzőként kell kezelni, és hulladékuk kezelése során a megfelelő elővigyázatossággal kell eljárni.
- Soha ne pipettázzon szájjal, és kerülje el a minták vagy a reagensek érintkezését a bőrrel vagy nyálkahártyával.
- Ne használja a reagenseket az üvegen feltüntetett lejáratú időn túl.
- A Stem-Count fluorogömbök és a Flow-Count fluorogömbök 1% formaldehidet tartalmaznak. Kerülje a bőrrel és szemmel való érintkezést, mivel a formaldehid visszafordíthatatlan sérüléseket okozhat ezekben a szövetekben. Ne lélegezze be a gőzt. Viseljen megfelelő védőfelszerelést, többek között gumikesztyűt és szemvédőt.
- A Stem-Kit reagenseket a tárolás és a használat során ne tegye ki erős fény vagy hő hatásának.
- Kerülje el a Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök párolgását vagy kiszivárgását, ellenkező esetben hibás eredmények keletkezhetnek. A használat után szorosan csavarja vissza a kupakot, és az üvegeket álló helyzetben tárolja.
- Gondoskodjon arról, hogy használat előtt teljes mértékben szuszpendálja a fluorogömböket. Kerülje a túlzott mértékű keverést, hogy minimalizálja a buborékok képződését. Ne vigyen be buborékokat a pipettával, mert ez hibás eredményt okozhat.
- A minták és a Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök adagolásához használjon kalibrált pipettát (lehetőleg pozitív kizorításos vagy ismétlő pipettát), ellenkező esetben hibás eredményeket kaphat.
- A minták és a Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök pontos és precíz pipettázása érdekében kövesse a pipetta gyártójának a pipettázási technikára vonatkozó ajánlásait, ellenkező esetben hibás eredmények keletkezhetnek.
- A megfestett és lizált mintákat jégen kell tárolni, és az áramlási citométeren kell analizálni a „Feldolgozott minta stabilitása” című szakaszban szereplő információk szerint, különben hibásak lehetnek az eredmények.
- Biztosítsa legalább 1000 Stem-Count fluorogömb vagy Flow-Count fluorogömb számlálását, különben nem történik meg az eredmények automatikus átszámítása abszolút sejtszámra.
- A Stem-Count fluorogömbök és a Flow-Count fluorogömbök minden tétele egy meghatározott koncentrációban tartalmaz fluorogömböket. Győződjön meg arról, hogy a helyes vizsgálati koncentrációt használja az abszolút sejtszámok meghatározása során.
- Ne használjon olyan előkészítő eljárást, amely mosási lépést tartalmaz, mivel az a sejtek észrevétlen elvesztését okozhatja.
- A megadottól eltérő inkubálási vagy keverési idő vagy hőmérséklet alkalmazása hibás eredményeket okozhat.
- A 7-AAD vitális festék 0,005% 7-AAD-t tartalmaz. A tömény 7-AAD potenciális karcinogén. Ez a vegyület erősen hígítva van, mégis javasoljuk a bőrrel vagy szemmel való érintkezése elkerülését és megfelelő laboratóriumi ruházat, gumikesztyű és szem-/arcvédő viselését.
- A 7-AAD vitális festék 1% dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmaz. A tiszta DMSO irritáló hatású. Ez a vegyület hígítva van, mégis javasoljuk a bőrrel vagy szemmel való érintkezése elkerülését és megfelelő laboratóriumi ruházat, gumikesztyű és szem-/arcvédő viselését.

18. A 7-AAD kromofór fényérzékeny. A folyamatos fényexpozíció elkerülése érdekében a 7-AAD vitális festéket tárolja a készlet kartoncsomagolásában.
19. Az összekevert mintákat inkubálás közben a lehető legkevesebb fény érje.
20. A reagensek kezelése során kövesse az általános jó laboratóriumi gyakorlatot.

GHS SZERINTI VESZÉLYESSÉGI BESOROLÁS

Stem-Count Fluorospheres

VESZÉLY!



H316

Enyhe bőrirritációt okoz.

H317

Allergiás bőrreakciót válthat ki.

H350

Rákot okozhat (karcinogén hatású lehet).

P201

Használat előtt ismerje meg a vizsgálatra vonatkozó különleges utasításokat.

P280

Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.

P308+P313

Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni.

P333+P313

Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.

P362+P364

Az szennyezett ruhadarabokat le kell vetni és használat előtt ki kell mosni.

Formaldehid 0,5 - 1,0%

keveréke;

5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on

[EK-szám: 247-500-7] és

2-metil-4-izotiazolin-3-on [EK-szám:

220-239-6] (3:1) keveréke < 0,05%

7-AAD életképesség-festék

FIGYELEM!

H316

Enyhe bőrirritációt okoz.

P332+P313

Bőrirritáció esetén: orvoshoz kell fordulni.

Dimetil-szulfoxid 0,5 - 2%



A biztonsági adatlap elérhető a következő weboldalon: beckman.com/techdocs

TÁROLÁSI FELTÉTELEK ÉS STABILITÁS

A bontatlan reagens 2–8 °C között, fénytől védve tárolva az üvegen megjelölt lejárati időig stabil. Ne használja a lejárati időn túl. Fagyasztani tilos. A Stem-Kit reagentek a Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök üvegének felnyitása után 30 napig maradnak stabilak. A felnyitott üvegeket használat után azonnal vissza kell zárni, és 2–8 °C között, fénytől védve kell tárolni. NE ossza részekre a Stem-Count fluorogömböket vagy Flow-Count fluorogömböket úgy, hogy eltávolítja az eredeti üvegéből.

FONTOS:

Hibás eredmények veszélye áll fenn, ha a Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök üvegéből folyadék szivárog. Felbontás után a Stem-Count fluorogömbök és Flow-Count fluorogömbök üvegét álló helyzetben kell tárolni, hogy ne szivárogjon ki a folyadék. Nem szabad a reagenst használni, ha szivárgásra utaló jelek láthatók.

A minőségromlás jelei

Az alábbi jelenségek a reagentek romlására utalhatnak:

Stem-Kit reagentek, kivéve a Stem-Count fluorogömböket

- Az alább ismertetett normális megjelenés megváltozása

Reagent	Normális megjelenés
CD45-FITC / CD34-PE	Átlátszó, kissé rózsaszínű folyadék
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Átlátszó vagy enyhén rózsaszínű folyadék
7-AAD életképesség-festék	Átlátszó, halvány rózsaszíntől pirosasig terjedő színű folyadék
NH ₄ Cl lizálóoldat	Átlátszó, színtelen folyadék

Stem-Count Fluorospheres

- Az összes fluorogömb több mint 20%-át tartalmazó szekunder fluoreszcens populációk megjelenése az adatgyűjtés közben.
- A sejtszámok vagy a minták mért eredményeinek nagyfokú változékonysága.

FONTOS: Romlásra utaló jelek esetén nem szabad használni a reagenseket, mert helytelen eredmények keletkezhetnek. Romlásra utaló jelek esetén hívja fel a Beckman Coulter helyi képviselőjét.

A reagensek előkészítése

- A CD45-FITC / CD34-PE és a CD45-FITC / IsoClonic Control-PE kétszínű reagenseket közvetlenül az üvegből, hígítás nélkül kell adagolni.
- A Stem-Count fluorogömböket vagy Flow-Count fluorogömböket közvetlenül az üvegből, hígítás nélkül kell adagolni. Az első felbontáskor az üveg tetejéről teljes egészében el kell távolítani az alumíniumból készült zárólemezt. Megfelelő összekeverés szükséges. A Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök üvegét az első használata előtt, a nap elején vortexelje 3–5 másodpercig.

Az üvegből való pipettázás előtt óvatosan forgassa át az üveget 3–5 alkalommal.

A nap elején végzett vortexelés után helyezze vissza a fluorogömbök üvegét 2–8 °C hőmérsékletre, amíg nem használja.

Az elpárolgás és a szivárgás elkerülése érdekében használat után az üveg kupakját szorosan csavarja rá.

- A 7-AAD vitális festék közvetlenül az üvegből, hígítás nélkül használható.
- Az 1-szeres töménységű NH₄Cl lizálóoldatot naponta el kell készíteni: kilenc egységnyi térfogatú deionizált vizet kell adni egy egységnyi 10-szeres koncentrációjú NH₄Cl lizálóoldathoz. Tilos fagyasztani. A fel nem használt 1-szeres NH₄Cl lizálóoldatot öntse ki a nap végén.

Használat előtt hagyja mindegyik reagenst felmelegedni szobahőmérsékletre (18–25 °C).

MINTÁK KEZELÉSE

A minták kezelésének követelményei

A minták kezelésének összefoglalása:

Minta típusa	Kapuzási módszer	Tárolási hőmérséklet	Minta kora
Aferézis	Algoritmusos	2–8 °C	24 óra
	Manuális	2–8 °C	24 óra
Csontvelő	Algoritmusos	2–8 °C	24 óra
	Manuális	2–8 °C	24 óra
Köldökszínórvér	Algoritmusos	18–25 °C	24 óra
	Manuális	18–25 °C	24 óra
Normál teljes vér	Algoritmusos	18–25 °C	20 óra
	Manuális	18–25 °C	20 óra
Mobilizált teljes vér	Algoritmusos	18–25 °C	20 óra
	Manuális	18–25 °C	20 óra

- A biológiai minták közé tartozik a friss normális vagy mobilizált perifériás teljes vér, valamint a friss vagy felolvasztott aferézistermékek, köldökszínórvér és csontvelő.
- Azokat a hemopoetikus progenitor sejteket (HPC), amelyeken valamilyen módosítást vagy tisztítást végeztek, kizárólag a manuális kapuzási módszerrel kell analizálni.
- Az aferézissel elválasztott termékeket, perifériásvér-mintákat, köldökszínórvér-mintákat és csontvelőmintákat aseptikus körülmények között kell venni, steril, üres, ACD formula A vagy K3 EDTA alvadésgátlót tartalmazó vérvételi csőbe.
- Az alvadésgátlót tartalmazó csövekben levett teljesvér- és mobilizált teljesvér minták festés előtt legfeljebb 20 órán át tárolhatók szobahőmérsékleten (18–25 °C).
- Az alvadésgátlót tartalmazó csövekben levett köldökszínórvér minták festés előtt legfeljebb 24 órán át tárolhatók szobahőmérsékleten (18–25 °C).

6. A levett, aferezissal elválasztott termékek és csontvelőminták festés előtt legfeljebb 24 órán át tárolhatók 2–8 °C-on.
7. A minta előkészítése előtt győződjön meg arról, hogy a fehérvérsejtek (FVS) koncentrációja nem magasabb, mint 30×10^9 FVS/L. Szükség esetén hígítsa a mintát HBSS vagy azzal egyenértékű oldattal, hogy átlagosan 15×10^9 FVS/L koncentrációjú legyen. A HPC-k abszolút számának kiszámításához jegyezze fel a hígítási tényezőt.
8. Az alacsony fehérvérsejtkoncentráció a Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök összetapadásához vezethet, és hibásan magas abszolút sejtszám mérését okozhatja. Az alacsony fehérvérsejtkoncentrációjú mintákat fehérvérrel dúsított pufferrel kell hígítani.
9. Minden mintát a Stem-Kit reagensek készletében található reagensekkel kell feldolgozni, beleértve a 7-AAD vitális festéket is.

A mintafeldolgozási eljárás

A vizsgálatokat két példányban végezze a „The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry” (ISHAGE irányelvek a CD34+ sejtek meghatározására áramlási citometriával) dokumentumnak megfelelően (1).

MEGJEGYZÉS: A manuális módszerrel végzett elemzéshez a Stem-Trol kontrollsejtek kezelésére vonatkozó részletes utasítások megtalálhatók a Stem-Trol kontrollsejtekhez mellékelt terméktájékoztatóban. Az automatikus módszerrel végzett elemzéshez lásd a stemONE rendszer szoftveréhez mellékelt stemONE System Guide (stemONE rendszer útmutató) vagy a stemCXP rendszer szoftveréhez mellékelt stemCXP System Guide (stemCXP rendszer útmutató) dokumentumot.

1. Minden mintához lászon el három kémcsövet az alábbi címkékkel:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipetázzon 20 µL CD45-FITC / CD34-PE reagenst a 45/34/7-AAD #1 és 45/34/7-AAD #2 mintacsövekbe.
3. Pipetázzon 20 µL CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagenst a 45/CTRL/7-AAD feliratú mintacsőbe.
4. Pipetázzon 20 µL 7-AAD vitális festéket mindegyik mintacsőbe.

FONTOS: A nem teljes lízis veszélye áll fenn, ha vérminta marad a kémcső tetején vagy oldalán. Legyen körültekintő pipetázáskor, hogy a vérminta ne érintse a kémcső tetejét vagy oldalát. Szükség esetén, a kémcső tetején vagy oldalán maradt vérminta eltávolítása céljából tisztítsa meg a kémcsövet vattapálcával.

5. Pozitív kisorfításos pipettával vagy ismétlő pipettával pipetázzon 100 µL betegmintát a mintacsőbe.
6. Azonnal vortexelje 5 másodpercig a kémcsövet.
7. Inkubálja mindegyik mintacsövet 20 percig szobahőmérsékleten (18–25 °C), fénytől védve.
8. Az inkubáció után adjon 2 mL elkészített 1-szeres NH₄Cl lizálóoldatot a kémcsőbe, és azonnal vortexelje 5 másodpercig.

MEGJEGYZÉS: A lizálóoldat elkészítésének részleteit olvassa el a fenti 7.2. A REAGENS ELŐKÉSZÍTÉSE című fejezetben.

FONTOS: Ha légbuborékokat juttat be a pipettával, hibás eredmények veszélye áll fenn. A Stem-Count fluorogömbök vagy a Flow-Count fluorogömbök túlzott mértékű keverése légbuborékok képződését okozhatja. A Stem-Count vagy Flow-Count fluorogömbök oldatát ne keverje túlzott mértékben, és ne juttasson be légbuborékokat pipettával a mintacsőbe.

9. Inkubálja 10 percig szobahőmérsékleten, fénytől védve.
10. Használat előtt a Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök elkeverése céljából óvatosan forgassa át az üveget 3–5 alkalommal.
11. Az adatgyűjtés előtt és közvetlenül a 9. lépés után dugattyús vagy ismétlő pipettával pipetázzon 100 µL Stem-Count fluorogömböt vagy Flow-Count fluorogömböt mindhárom csőbe.
12. Közvetlenül ezután 5 másodpercig vortexelje a mintacsöveket.

MEGJEGYZÉS: A lizálóoldat elkészítésének részleteit olvassa el a fenti 7.2. A REAGENS ELŐKÉSZÍTÉSE című fejezetben.

A mintafestés összefoglalása

Reagensek/minták	45/34/7-AAD #1	Tesztcső címkéje: 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD életképesség-festék	20 µL	20 µL	20 µL
Vizsgálati anyag	100 µL	100 µL	100 µL
Vortexelje, majd inkubálja 20 percig szobahőmérsékleten. Fénytől védendő.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vortexelje, majd inkubálja 10 percig szobahőmérsékleten. Fénytől védendő.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex			
A levett, aferezissal elválasztott termékek, köldökzsínórvér-minták és csontvelőminták esetében az adatgyűjtés előtt ne hagyja 60 percnél hosszabb ideig jégen a mintákat.			
Teljesvér- és mobilizált teljesvér-minták esetében az adatgyűjtés előtt ne hagyja 45 percnél hosszabb ideig jégen a mintát.			
A felolvasztott mintákat azonnal analizálni kell.			
Fénytől védve tartandó			

Feldolgozott minta stabilitása:

- A levett, aferezissal elválasztott termékek, köldökzsínórvér-minták és csontvelőminták esetében a Stem-Count vagy a Flow-Count fluorogömbök hozzáadása után, az adatgyűjtés előtt ne hagyja 60 percnél hosszabb ideig jégen a mintákat.
- A teljesvér- és mobilizált teljesvér-minták esetében a Stem-Count vagy a Flow-Count fluorogömbök hozzáadása után, az adatgyűjtés előtt ne hagyja 45 percnél hosszabb ideig jégen a mintát.
- Fagyasztott minta esetén az adatgyűjtést közvetlenül a Stem-Count vagy Flow-Count fluorogömbök hozzáadása után kell elvégezni.
- A feldolgozott mintákat jégen, fénytől védett helyen kell tárolni, és az adatgyűjtés során a lehető legnagyobb mértékben korlátozni kell a szobahőmérséklet felmelegítési hatását.

A CSOMAG TARTALMA

A nátrium-azid tartósítószer robbanékony vegyületeket képezhet a fém lefolyócsövekben. Lásd az alábbi NIOSH-közleményt: Explosive Azide Hazard (Rohbanékony azidokkal kapcsolatos veszélyek) (76. 8. 16.).

Az azidvegyületek esetleges felhalmozódásának elkerülése érdekében a hígítatlan reagens szennyvízfolyóba történő kiöntése után a szennyvízvezetékét vízzel át kell öblíteni. A nátrium-azid ártalmatlanítását a vonatkozó helyi előírásoknak megfelelően kell végezni.

SZÜKSÉGES, DE A KÉSZLETTEL NEM SZÁLLÍTOTT ANYAGOK:

- Ionmentes víz.
- Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldat (HBSS) vagy azzal egyenértékű
- Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
- Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
- Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
- CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
- QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
- A Stem-Count Fluorospheres alternatívája: Flow-Count Fluorospheres (REF. 7547053)
- Jeges vízfürdő
- Műanyag mintacsövek (12 x 75 mm)
- Kalibrált ismétlő pipetta (20 µL, 100 µL, 2 mL) vagy pozitív kiszorításos pipetta (20 µL, 100 µL, 2 mL) és pipettahegyek
- Kalibrált normál pipetta (20 µL, 100 µL, 2 mL) és pipettahegyek.
- Vortex keverő.
- Stopperóra.
- Áramlási citométer.

16. stemCXP 2.0-s szoftvercsomag, stemCXP 2.0-s verzió, WIN 7, CSAK automatizált mintaanalízishez a CXP szoftverrel (2.0-s verzió) működő FC 500 áramlási citométer rendszeren.

EREDMÉNYEK

Az elemzési protokoll beállítása

Az áramlási citométer alkalmas kell, hogy legyen az előre szóródás, az oldalra szóródás és négy fluoreszcenciás csatorna mérésére. Az FL3 csatornához (a Stem-Count vagy a Flow-Count fluorogömbök monitorozására) használjon 620 nm-es sáváteresztő szűrőt. Az FL4 csatornához (a 7-AAD vitális festék monitorozására) használjon 675 nm-es aluláteresztő szűrőt.

Győződjön meg arról, hogy az áramlási citométer megfelelően van irányba állítva, és standardizálva van a fluoreszcenciaintenzitás szerint.

Győződjön meg arról, hogy az áramlási citométer fluoreszcenciakompensációja megfelelően van beállítva.

MEGJEGYZÉS: A minta elemzése esetén mindegyik terület elhelyezkedése csak megközelítő érték az 45/34/7-AAD #1 mintacső mérésének befejezéséig. A területek optimalizálása a alábbi protokoll szerint történik, ezután pedig NEM történik kompenzáció a panelben lévő második és harmadik mintacső szerint.

A minta elemzéséhez 8 hisztogramot kell készíteni a kapuzási séma követésével (lásd alább). A CD34+ kontrollsejtek használata esetén ugyanazt a 8 hisztogramot kell elkészíteni ugyanazzal a kapuzási sémával. Az A, B, C és D területet (a definíciót lásd a „Területek létrehozása” fejezetben) úgy kell módosítani, hogy tartalmazzák a CD34+ kontrollsejtek jellemző csoportját.

Hisztogram létrehozása

Hozzon létre hisztogramokat a következők szerint:

1. Hozza létre az 1. hisztogramot: FL1 CD45-FITC vs. oldalra szóródás.
2. Hozza létre a 2. hisztogramot: FL2 CD34-PE vs. Side Scatter (oldalra szóródás).
3. Hozza létre az 3. hisztogramot: FL1 CD45-FITC vs. oldalra szóródás.
4. Hozza létre a 4. hisztogramot: előre szóródás vs. oldalra szóródás.
5. Hozza létre az 5. hisztogramot: FL1 CD45-FITC vs. FL2 CD34-PE.
6. Hozza létre a 6. hisztogramot: előre szóródás vs. oldalra szóródás.
7. Hozza létre a 7. hisztogramot: Idő vs. FL3 Stem-Count vagy Flow-Count fluorogömbök.
8. Hozza létre a 8. hisztogramot: FL4 7-AAD vitális festék vs. oldalra szóródás.

Az 1–4. hisztogramok a CD34+ HPC jellemzésére szolgálnak; ezt az eljárást el lehet halasztani az elemzési lépésig. Ez az első négy hisztogram az ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (ISHAGE irányelvek CD34+ sejtek meghatározására áramlási citometriával) dokumentumnak megfelelően van beállítva (1, 2). Az 5–7. hisztogramok olyan paraméterek monitorozására szolgálnak, amelyek fontosak lehetnek az adatmérési lépés során. Ide tartozik az előre szóródási diszkriminátor, az összegyűjtendő CD45+ események száma és az egyedi fluorogömbök megfelelő összegyűlése.

A 8. hisztogram az élő és a nem élő sejtek által okozott események megkülönböztetésére és elemzésére szolgál.

Területek létrehozása

Hozzon létre területeket a következők szerint:

1. hisztogram – Hozza létre az 1. hisztogramon az egyenes vonalakkal határolt A területet, amely tartalmazza az összes CD45+ fehérvérsejtet, és nem tartalmazza a trombocitákat, a vörösvértest-törmelékeket és az aggregátumokat.
2. 1. hisztogram – Hozzon létre az 1. hisztogramon egy amorf E területet, amely a limfocitákat tartalmazza (erős CD45 festődés, alacsony oldalra szóródás).
3. 2. hisztogram – Hozza létre az egyenes vonalakkal határolt B területet a 2. hisztogramon, amely tartalmazza az összes CD34+ eseményt. Állítson be 75 000 eseményt (CD45+ események) leállítási számnak a 2. hisztogramon.
4. 3. hisztogram – Hozzon létre a 3. hisztogramon egy amorf C területet, amely tartalmazza az összes halmozott, CD45halvány eseményt.
5. 4. hisztogram – Hozzon létre egy AMORPHOUS (amorf) D területet a 4. hisztogramon, amely tartalmazza az összes halmozott eseményt közepes side scatter (oldalra szóródás) és középestől magasig terjedő Forward Scatter (előre szóródás) mellett.
6. 5. hisztogram: Hozzon létre egy Quadstat I területet az 5. hisztogramon, a CD34+ eseményeken a CD45 expressziója alsó határértékének igazolására.

7. 5. hisztogram – Hozzon létre az 5. hisztogramon egy amorf H területet, amely tartalmazza az összes Stem-Count vagy Flow-Count fluorogömböt, beleértve a duplákat is. A H területnek az 5. hisztogram jobb felső sarkában kell lennie.

MEGJEGYZÉS: Győződjön meg arról, hogy a H terület AMORPHOUS (amorf) területként van megrajzolva.

8. 5. hisztogram – Hozza létre az 5. hisztogramon az egyenes vonalakkal határolt K területet („listgate”). Állítsa a K terület határát a kétparaméteres hisztogram első logaritmikus tizedére. Ez a K terület lehetővé teszi a duplán negatív események eltávolítását a mérés közben, hogy 75 000 releváns CD45+ esemény mérése történjen.
9. 6. hisztogram – Másolja a 4. hisztogramon található D területet a 6. hisztogramon található F területre.
10. 7. hisztogram – Hozzon létre a 7. hisztogramon egy egyenes vonalakkal határolt G területet, amely csak az egyedi Stem-Count fluorogömböket vagy Flow-Count fluorogömböket tartalmazza. A G területnek adható a „CAL” címke, hogy lehetővé tegye a CD34+ HPC események abszolút számának automatikus számítását (további részletek a készülék kézikönyvében találhatók).
11. 8. hisztogram – Hozzon létre a 8. hisztogramon egy egyenes vonalakkal határolt J területet, amely az élő fehérvérsejteket (a 7-AAD vitális festésre negatív eseteket) tartalmazza.

Kapu létrehozása

Hozzon létre kapukat a következők szerint:

1. hisztogram – Jelölje ki az 1. hisztogramon a „J” területet, amely tartalmazza az összes élő eseményt. Ha nem használ 7-AAD-t, jelölje ki az 1. hisztogramon a „H” területet, amely tartalmazza az összes eseményt, kivéve az összes Stem-Count fluorogömböt vagy Flow-Count fluorogömböt, beleértve a duplákat is.
2. hisztogram – Jelölje ki az „AJ” területet („A” területet, ha nem használ 7-AAD-t) a 2. hisztogramon, amely tartalmazza az élő CD34+ eseményeket (az összes eseményt, ha nem használ 7-AAD-t).
3. hisztogram – Jelölje ki a 3. hisztogramon az „A”, „B” és „J” területet („A” és „B” területet, ha nem használ 7-AAD-t), amely tartalmazza mindegyik élő (illetve, ha nem használ 7-AAD-t, mindegyik) CD45+ CD34+ eseményt.
4. hisztogram – Jelölje ki a 4. hisztogramon az „A”, „B”, „C” és „J” területet („A”, „B” és „C” területet, ha nem használ 7-AAD-t), amely tartalmazza az élő (illetve, ha nem használ 7-AAD-t, mindegyik) CD45+ CD34+ eseményt, amelyek alacsony oldalra szóródást mutatnak, miközben kizárja a vérelemekket és a sejttörmelékeket. Az ABCDJ terület eseményei valódi, élő CD34+ HPC események.
5. hisztogram – Nincs kapuzva, hogy minden esemény megjelenjen.
6. hisztogram – Jelölje ki a 6. hisztogramon az „EJ” területet (az „E” területet, ha nem használ 7-AAD-t), amely tartalmazza az élő limfocitákat (az összes limfocitát, ha nem használ 7-AAD-t) a diszkriminátor vizuális ellenőrzéseként.
7. hisztogram – Hozzon létre a 7. hisztogramon egy „H” területet, amely megjeleníti az összes Stem-Count fluorogömböt vagy Flow-Count fluorogömböt, beleértve a duplákat is.
8. hisztogram – Jelölje ki a 8. hisztogramon az „A” területet, amely a CD45+ eseményeket tartalmazza.

Az áramlási citométer beállítása

- Ellenőrizze, hogy az áramlási citométer megfelelően van-e irányba állítva és optimalizálva az FL1, FL2, FL3 és FL4 detektorok fényszóródásához és fluoreszcencia-intenzitásához a gyártó és a laboratórium irányelveinek megfelelően. Ellenőrizze, hogy a normál üzemmóddhoz be van-e állítva a színtkompenzáció. További utasítások a készülék kézikönyvében találhatók.
- 5 másodpercig vortexelje a kémcsöveket.
- Végezzen adatmérést az áramlási citométerrel. Legalább 75 000 CD45+ eseményt kell vizsgálni.
- Mintaelemzéshez: Állítsa be a diszkriminátort és a területeket a 45/34/7-AAD #1 mintacső vizsgálata segítségével. Mentse el a protokollt, és analizálja a 45/34/7-AAD #2 és a 45/CTRL/7-AAD mintacsövet további módosítások nélkül.

Példavizsgálat

A FÜGGELÉKBEN látható hisztogramok a számok emelkedő sorrendjében jelennek meg, úgy, mint a protokollban.

A minta CD34+ HPC-tartalmának számítása

A CD34+ HPC-k száma a két ismételt minta (45/34/7-AAD #1 és 45/34/7-AAD #2) D területe statisztikai eredményeinek átlagaként számítható.

A CD34+ HPC eredmények érvényesnek minősülnek, ha a CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagenssel nyert eredmény a CD34+ HPC eredményének kevesebb mint 10%-a.

- Minden minta esetén átlagolja a 45/34/7-AAD #1 és a 45/34/7-AAD #2 mintacsövek eredményeit (ez a statisztikai lapokon a D terület eredményeinek átlaga). A CD34+ HPC-k száma alacsonyabb lehet, mint a két ismételt minta átlagának a 10%-a. Az eredmények hitelesítéséhez a 45/CTRL/7-AAD kontrollcső mérésének eredménye alacsonyabb kell, hogy legyen a mintacsövek eredményei átlagának 10%-ánál.

MEGJEGYZÉSEK: Ha a két méréssel meghatározott CD34+ HPC-k abszolút száma az elfogadható tartományon kívül esik (több mint 10%), vizsgálja meg, hogy a pipettázás megfelelően történt-e, főként a Stem-Count fluorogömbök vagy a Flow-Count fluorogömbök esetén. Tekintse meg az áramlási citométer jelentéseit és a festési és a lizálási eljárás eredményét a kémcsövekben. Ellenőrizze, hogyan történt a területhatárok meghatározása.

Ha a 45/CTRL/7-AAD eredménye az elfogadható tartományon kívül esik (meghaladja a kétszeri méréssel kapott abszolút számok átlagának 10%-át), vizsgálja meg, hogy a pipettázás megfelelően történt-e, főként a Stem-Count fluorogömbök vagy Flow-Count fluorogömbök esetén. Tekintse meg az áramlási citométer jelentéseit és a festési és a lizálási eljárás eredményét a kémcsövekben. Ellenőrizze, hogyan történt a területhatárok meghatározása.

Szükség esetén ismételje meg a mérési lépést egy BLANK mintacső hozzáadásával az első dupla, 45/34/7-AAD #1 és #2 mintacső után, a 45/CTRL/7-AAD mintacső előtt. Szükség esetén ismételje meg az egész előkészítést új kémcsövek használatával és egy BLANK mintacső hozzáadásával. Végezze el az adatgyűjtést és az elemzést az új és az előző mintacsősorozat esetében. Hasonlítsa össze az eredményeket. Ha az eredmények nem egyeznek, hívja fel a Beckman Coulter helyi képviselőjét.

2. Ha a minta hígítva volt, a fent kapott eredményeket meg KELL szorozni a megfelelő hígítási tényezővel (Dil). A kapott végeredmény a CD34+ HPC sejtek abszolút száma (sejt/ μ L).

$\text{CD34+ HPC abszolút sejtszám (sejt}/\mu\text{L)} = \text{a CD34+ HPC abszolút sejtszám statisztikai lapján található eredmény (sejt}/\mu\text{L)} \times \text{Dil}$
--

3. Az aferézistermékeket tartalmazó csomag esetén a CD34+ HPC-k csomagonkénti száma az alábbi képlettel számítható:

$\text{A CD34+ HPC-k teljes száma csomagonként} = \text{CD34+ HPC-k abszolút sejtszáma (sejt}/\mu\text{L)} \times 10^6 \times \text{a csomag térfogata (L)}$
--

Ahol:

4. A CD34+ HPC sejtek százalékos arányának meghatározásához a CD45+ fehérvérsejtek között használja az alábbi képletet:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{A CD34+ HPC-k abszolút száma (sejt}/\mu\text{L)} \times 100}{\text{CD45+ fehérvérsejtek abszolút száma (sejt}/\mu\text{L)} \times 100} \times 100$$

(a D terület statisztikai lapján található eredmények) (az A terület statisztikai lapján található eredmények)

MINŐSÉG-ELLENŐRZÉS

Ügyeljen arra, hogy az áramlási citométer megfelelően legyen irányba állítva, a gyártónak a készülék kézikönyveiben található javaslatainak megfelelően. A célintenzitásokat úgy határozták meg, hogy optimálisak legyenek a készülék fényszórási és fluoreszcencia-beállításai a CD45-FITC / CD34-PE monoklonális antitest reagensekkel és CD45-FITC / Isoclonic Control-PE reagensekkel festett minták vizsgálatához.

A fluoreszcein-izotiocianát (FITC), a fikoeritrin (PE) és a 7-amino-aktinomycin-D festék (7-AAD) fluorokrómok különböző hullámhosszú fényt bocsátanak ki, de a spektrumaik bizonyos mértékig átfedik egymást, amit elektronikus kompenzációval kell korrigálni. Az optimális kompenzációs szint megállapításához kétparaméteres hisztogramban CXP szoftverrel elemezni kell egy Stem-Trol Control Cells kontrollsejtekkel kiegészített, 7-AAD vitális festékkel vagy megfelelő kompenzációs reagensekkel festett teljesvér-mintát. Ennek az elemzésnek a keretében beállítások történnek annak érdekében, hogy a kétszeresen festődő kvadránsban ne legyen egyetlen fluorokrómmal festett esemény.

A 7-AAD vitális festék (7-amino-aktinomycin-D) az áramlási citometriás vizsgálat során az élettelen sejtek azonosítására használatos, lehetővé téve az élő, vizsgált sejtek számlálását. Az elhalt sejtek felveszik a festéket (fényes események), ezeket kell azután kapuzással kizárni az élő sejtek közül (negatív események) (lásd a 8. hisztogramot).

A minták elemzése előtt vizsgált kontrollt (Stem-Trol kontrollsejteket) kell festeni az antitestek reakcióképességének ellenőrzéséhez.

TELJESÍTMÉNY

A megadott teljesítményjellemzők a Stem-Kit reagensek és a System II szoftverrel működő COULTER EPICS XL/XL-MCL áramlási citométer használatára vonatkoznak. A CXP szoftverrel működő FC 500 készülék teljesítményének példái a stemCXP System Guide (stemCXP rendszer útmutatója) dokumentumban találhatók.

Referenciatartományok várható értékei

Normál teljesvér-mintákat (n=117) gyűjtöttek férfiaktól (n=58) és nőktől (n=59) a normál referenciatartomány megállapítása céljából. A vizsgálatot egy külső helyszínen végezték. Minden mintához az ismételt vizsgálat elkészítése a Stem-Kit reagensekhez mellékelt terméktájékoztatónak megfelelően történt. Manuális kapuzással és elemzéssel meghatározták a CD45+, a CD34+ és a CD34% értékeket.

A statisztikai elemzés a gyűjtött adatok nem Gauss-görbét alkotó eloszlására utal. Ezen eredmények alapján nem paraméteres (robosztus) megközelítést alkalmaztak az adatok elemzéséhez. Meghatározták a CD45+, a CD34+ és a CD34% értékeket. Az értékek abszolút sejtszám (sejt/ μ L) formájában vannak kifejezve a CD45+ és a CD34+ esetében, a CD34% esetében pedig a teljes fehérvérsejtszám százalékában, lásd az alábbi táblázatot.

Normális teljes vér: referenciatartományok

Manuális módszer (robosztus elemzés)	n	CD45+ (sejt/ μ L)				CD34+ (sejt/ μ L)				CD34+ (%)			
		Min.	Max	Közép	SD	Min.	Max	Közép	SD	Min.	Max	Közép	SD
Manuális	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Ezek az értékek csak tájékoztatásul szolgálnak. Az egyes laboratóriumoknak meg kell határozniuk a saját várt értékeiket a helyi egészséges donorok populációjából.

Linearitás

2-féle minta: perifériás teljes vér hozzáadott CD34+-szal, illetve friss mobilizált perifériás teljesvér-minták ismételt méréseit végezték mind a 10 sorozatos hígítás mellett. A CD34+ HPC-k koncentrációjának mérésénél 0 és 2000 sejt/ μ L közötti dinamikus tartományt és 0 és 150 sejt/ μ L közötti alsó érzékenységi tartományt lehetett megállapítani. A minták előkészítése a Stem-Kit reagensek terméktájékoztatójának megfelelően történt, és az elemzést COULTER EPICS XL/XL-MCL áramlási citométerrel végezték. Az értékek abszolút sejtszámban (sejt/ μ L) vannak megadva. Az eredményeket az ismételt mérések átlagának a várt eredménye és a mért abszolút sejtszámok mínusz az endogén CD34+ sejtek száma lineáris regressziós analízisével értékelték. Lásd az alábbi táblázatokat.

Az összes CD34+ HPC abszolút számának grafikonján látható regressziós vonalak meredeksége mutatja a linearitás matematikai mérőszámát. Ezt alátámasztja a vizsgálat minimális mértékű potenciális torzítása, amit az elemzések y tengely metszéspontja mutat. A várt abszolút sejtszámok nagyfokú korrelációt mutatnak a mért abszolút sejtszámokkal.

CD34+ sejtekkel dúsított teljes vérrel kapott eredmények

A grafikont lásd a függelékben.

Perifériás (mobilizált) vérrel kapott eredmények

A grafikont lásd a függelékben.

A módszer pontossága (táblázatok) (A várt és a tényleges eredmények)

A módszer pontosságának definíciója a várt és a tényleges eredmények közötti megegyezés mértéke mind a manuális, mind az automatikus kapuzási és elemzési módszer alkalmazása esetén. Friss normál perifériás teljes vérhez adtak tisztított CD34+ sejteket 1875 sejt/ μ L koncentráció eléréséhez. A sejtszámokat Malassez tárgylemezes hemocitométerrel erősítették meg, majd a mintát sorozatosan hígították különböző koncentrációkra. Összehasonlították az automatikus és a manuális kapuzással és elemzéssel végzett kétszeres mérések eredményei átlagának várt és tényleges eredményeit minden hígítási szint esetében. A meredekségnek és a metszéspont ordináta értékének a vizsgálata nem mutatott statisztikai különbséget az automatikus kapuzással és elemzéssel kapott eredmények és a várt érték között, sem a manuális kapuzással és elemzéssel kapott eredmények és a várt érték között.

A módszer pontossága – CD34+ (%)

A grafikont lásd a függelékben.

A módszer pontossága – CD34+ sejtek abszolút száma (sejt/ μ L)

A grafikont lásd a függelékben.

A módszer pontossága – összes fehérvérsejt – CD45+ (sejt/ μ L)

A grafikont lásd a függelékben.

A módszer pontossága (automatikus és manuális eredmények)

A pontosság mértékét a stemONE rendszer automatikus és a manuális módszer között négy külső értékelési helyszínen vizsgálták friss perifériás teljes vér és friss vagy felolvasztott aferézistermékek, köldökszínórvér, illetve csontvelőminta használatával. A konfidencia-intervallumok (CI) számítása 95%-os határértékkel történt.

Friss perifériás teljes vér (n=59, három helyszínről), friss aferézis termékek (n=51, három helyszínről), friss köldökszinórvér (n=29, két helyszínről), friss csontvelő (n=33, két helyszínről), felolvasztott aferézis termékek (n=23, egy helyszínről), felolvasztott köldökszinórvér (n=31, két helyszínről) és felolvasztott csontvelő (n=20, egy helyszínről) mintákat készítettek elő és vizsgáltak COULTER EPICS XL/XL-MCL áramlási citométeren, a Stem-Kit reagensekhez mellékelt terméktájékoztatónak megfelelően. Automatikus és manuális kapuzással és elemzéssel is meghatározták a CD45+, a CD34+ és a CD34% értékeket.

A módszerek pontossága (ábrák)

Friss perifériás teljesvér-minták (n=59)

A grafikont lásd a függelékben.

Friss aferézis termék minták (n=51)

A grafikont lásd a függelékben.

Friss köldökszinórvér minták (n=29)

A grafikont lásd a függelékben.

Friss csontvelőminták (n=33)

A grafikont lásd a függelékben.

Felolvasztott aferézis termék minták (n=23)

A grafikont lásd a függelékben.

Felolvasztott köldökszinórvér minták (n=31)

A grafikont lásd a függelékben.

Felolvasztott csontvelőminták (n=20)

A grafikont lásd a függelékben.

Pontosság

Laboratóriumok közötti pontosság

A vizsgálatokat egy klinikai intézményben végezte három kezelő, mindegyikük különböző áramlási citométeren. A CD34+ dinamikus tartományának (0–2000 sejt/ μ L) különböző részeit képviselő három mintát azonosítottak:

Alacsony tartomány:	friss, mobilizált perifériás teljes vér
Középső tartomány:	aferézis termék
Magas tartomány:	aferézis termék

Ezeket a mintákat felosztották három adagra, és mindegyik szintből (alacsony, közepes, magas) egy-egy adagot adtak mindhárom kezelőnek. Mindegyik adagból mintákat készítettek (n=10) a Stem-Kit reagensekhez mellékelt terméktájékoztatónak megfelelően. Mindegyik kezelő EPICS XL áramlási citométerrel, automatikus és manuális kapuzással és analízissel végzett vizsgálatot a CD45+, a CD34+ és a CD34% értékek meghatározásához. Az értékeket a teljes fehérvérsejtszám százalékában (%) és abszolút sejtszámként (sejt/ μ L) lehet kifejezni.

A laboratóriumok közötti pontossági vizsgálat eredményei, szintenként, az alábbi táblázatokban láthatók. A CD45+ és a CD34+ abszolút sejtszám és a CD34 százalékos értékei csekély eltérést mutattak az átlag, a szórás és az ismételt vizsgálatok variációs koefficiense tekintetében.

A grafikont lásd a függelékben.

Laboratóriumon belüli pontosság

A vizsgálat dinamikus tartományát lefedő mintákat analizáltak: négy külső vizsgálóhelyről származó friss perifériás teljes vért, friss csontvelőt és friss és felolvasztott aferézis termékeket és köldökszinórvért. Mindegyikből tíz mintát készítettek a Stem-Kit reagensekhez mellékelt terméktájékoztatónak megfelelően, és ezeket COULTER EPICS XL/XL-MCL áramlási citométerrel vizsgálták a CD45+, a CD34+ és a CD34% értékek meghatározásához.

A CD45+, a CD34+ és a CD34% értékei a következő táblázatban azt mutatják, hogy a mérések átlaga, szórása és variációs koefficiense tanúsága szerint az elemzési módszer reprodukálható. A FÜGGELÉKBEN található adattáblázatok mutatják a vizsgálat laboratóriumon belüli pontosságát.

A grafikont lásd a függelékben.

KORLÁTOZÁSOK

Az automatikus módszer használatára vonatkozó korlátozásokat lásd a stemCXP rendszerszoftverhez mellékelt stemCXP System Guide (stemCXP rendszer útmutató) dokumentumban.

- A megfestett és lizált mintákat jégen kell tárolni, és az áramlási citométeren kell analizálni a „Feldolgozott minta stabilitása” című szakaszban szereplő információk szerint, különben hibásak lehetnek az eredmények.
- Ne hígítsa, ne ossza több részre, és ne fagyassza a reagenseket. Kizárólag úgy használja, ahogy csomagolva volt.
- A reagensek csak áramlási citometriás mérésekhez használhatók.
- A fagyasztott mintákat megfelelően olvassza fel az optimális festődés biztosítása érdekében.
- Előfordulhat, hogy nem lehet minden vörösvértestet lizálni a következő esetekben: magas vörösvértestek jelenléte, rendellenes fehérjekoncentráció vagy hemoglobinopátiák jelenléte. Ez hamisan alacsony CD34% eredményekhez vezethet, mivel a készülék fehérvérsejteként számolja a nem lizált vörösvértesteket. Ez nem érinti a CD34+ és CD45+ abszolút sejtszámokat.
- Bizonyos betegeknél speciális problémák lehetnek jelen bizonyos sejtpopulációk megváltozott vagy nagyon alacsony száma miatt.
- Az áramlási citometriával kapott eredmények hibásak lehetnek, ha a kapuk nem megfelelően lettek beállítva.
- A Stem-Kit reagensek a 7-AAD vitális festék használatára vannak tervezve az élő HPC-k meghatározásához. Ha az Ön laboratóriumában másféle módszerrel végzik az élő sejtek meghatározását, kövesse az általános jó laboratóriumi gyakorlatot a kapott eredmények minőségének biztosításához.

VÉDJEGYEK

A Beckman Coulter, a stilizált logó, valamint az itt említett Beckman Coulter termék- és szolgáltatásjegyek a Beckman Coulter, Inc. védjegyei vagy bejegyzett védjegyei az Amerikai Egyesült Államokban és más országokban.

TOVÁBBI INFORMÁCIÓK

www.beckmancoulter.com

Szimbólumok listája

A szimbólumok jegyzéke elérhető a következő weboldalon: beckman.com/techdocs (dokumentumszám: B60062)



Stem-Kit odczynniki

REF IM3630 50 testów

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

PRZEZNACZENIE

Odczynniki Stem-Kit zawierają dwubarwny, fluorescencyjny (FITC, PE) odczynnik mysiego przeciwciała monoklonalnego, dwubarwną, mysią, fluorescencyjną (FITC, PE) kontrolę izokloniczną, odczynnik liczby bezwzględnej, odczynnik żywotności komórek oraz odczynnik lityczny. Jest on przeznaczony „Do stosowania w diagnostyce *in vitro*” do jednoczesnej identyfikacji i liczenia CD45+ oraz podwójnie dodatnich odsetek populacji komórkowych CD45+ CD34+ i liczb bezwzględnych w próbkach biologicznych za pomocą cytometrii przepływowej. Próbkę biologiczną obejmują świeżą prawidłową lub mobilizowaną obwodową krew pełną oraz świeże lub rozmrażane produkty aferezy, krew pępowinową i szpik kostny. Pomiar populacji komórek mogą być uzyskane za pomocą metody automatycznej lub ręcznej do bramkowania i analizy.

Pełne instrukcje stosowania metody ręcznej zawiera ulotka dołączona do opakowania odczynników Stem-Kit Reagents. Pełne instrukcje przeprowadzania metody automatycznej zawiera stemCXP System Guide (Przewodnik systemu stemCXP) dostarczony z zestawem oprogramowania stemCXP 2.0 i wersją 2.0 stemCXP, WIN 7.

PODSUMOWANIE

Hematopoetyczne komórki progenitorowe (HPC)

Odczynniki Stem-Kit są opracowane do identyfikacji ludzkich hematopoetycznych komórek progenitorowych (HPC) przy użyciu następujących kryteriów: „Prawdziwe komórki CD34+ (a) wykazują ekspresję antygenu CD34, (b) wykazują ekspresję antygenu CD45 z barwieniem intensywności charakterystycznym dla komórek blastycznych (tj. łatwo wykrywalnych, ale przy niższych stężeniach niż limfocyty i monocyty) oraz (c) wykazują niskie rozpraszanie boczne i niskie do umiarkowanego rozpraszanie do przodu charakterystyczne dla komórek blastycznych” (1). Wykluczenie martwych CD34+ HPC z liczenia żywotnych CD34+ HPC uzyskuje się za pomocą barwnika 7-AAD Viability Dye (2).

CD34

Antygen CD34 to rodzina różnorodnie glikozylowanych, jednołańcuchowych glikoprotein przez błonowych typu I (3, 4, 5). Ulega on ekspresji na praktycznie wszystkich hematopoetycznych komórkach prekursorowych, w tym multipotencjalnych komórkach macierzystych. Epitopy CD34 podzielono na trzy klasy na podstawie wrażliwości na neuroaminidazę i glikoproteazę *Pasteurella haemolytica* (6). Przeciwciała monoklonalne (mAb) CD34 stosowane w odczynnikach Stem-Kit nazywa się 581. Rozpoznaje ono swoiście epitop klasy III cząsteczki CD34 (7), jak definiują to wzorce rozszczepiania enzymatycznego (6, 8). To przeciwciała monoklonalne 581 przydzielono do CD34 podczas konferencji 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5. międzynarodowe warsztaty dotyczące antygenów różnicujących ludzkie leukocyty) w Bostonie, Massachusetts, USA, in 1993 (7).

CD45

Przeciwciała CD45 rozpoznaje członków rodziny CD45 wspólnych antygenów leukocytów o masach molekularnych 180, 190, 210 i 220 kD (9, 10, 11). Jest także znane jako wspólny antygen leukocytów (ang. leukocyte common antigen, LCA). Antygen CD45 ulega ekspresji na każdym rodzaju komórek hematopoetycznych z wyjątkiem dojrzałych erytrocytów i ich bezpośrednich progenitorów (11, 12). Nie był wykrywany w zróżnicowanej tkance niehematopoetycznej (12, 13, 14, 15). mAb CD45 używane w odczynnikach Stem-Kit nazywa się J33. Przydzielono je do CD45 podczas konferencji 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3. międzynarodowe warsztaty dotyczące antygenów różnicujących ludzkie leukocyty) w Oksfordzie, Anglia, w 1986 r. (16).

7-AAD

Barwnik 7-amino-aktynomycyna D (7-AAD) Viability Dye to analog aktynomycyny D, który zawiera podstawioną grupę aminową w pozycji 7 chromoforu. Barwnik 7-AAD Viability Dye jest włączany między zasady cytozyny i guaninę DNA (15). Aktynomycyny są związkami czynnymi biologicznie zawierającymi chromofor 2-amino-4, 6 dimetylofenoksazono-3 i dwa cykliczne pentapeptydy (17). Aktynomycyny tworzą stabilne kompleksy z dwuniciowym kwasem dezoksyrybonukleinowym (DNA), ale nie z dwuniciowym kwasem rybonukleinowym (RNA) ani z hybrydami RNA-DNA lub jednoniciowym DNA bądź RNA (15, 18).

Właściwości widmowe barwnika 7-AAD Viability Dye czynią tę cząsteczkę szczególnie odpowiednią do analizy cytometrii przepływowej (17). Maksymalna absorpcja kompleksu 7-AAD/DNA znajduje się w zielonym obszarze widmowym i dlatego jest odpowiednia dla cytometru wyposażonego w laser argonowy (długość fali wzbudzenia równa 488 nm) (15). Emisje głębokiej czerwieni barwnika 7-AAD Viability Dye (od 635 do 675 nm) czynią stosowanie tej sondy łatwiejszym w połączeniu z przeciwciałami sprzężonymi z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) i fikoerytryną (PE) ponieważ, w odróżnieniu od jodku propidyny (PI), kompleks 7-AAD/DNA wykazuje minimalne nałożenie widma z FITC i PE (17).

Komórki apoptotyczne, martwicze i (lub) uszkodzone są źródłem zakłóceń w analizie komórek żywotnych przy użyciu cytometrii przepływowej. Komórki nieżywotne powinny być oceniane i rozróżniane dzięki koncentracji na barwieniu 7-AAD-dodatnim, gdy komórki żywotne pozostają niewybarwione (ujemne) (19).

Systemy cytometrii przepływowej

Systemy cytometrii przepływowej (FC 500) wykorzystują zasadę cytometrii przepływowej do badania próbek biologicznych w celu identyfikacji różnych populacji komórkowych określanych przy użyciu stosowanych swoistych przeciwciał monoklonalnych i fluorochromów. Niniejszy test wykorzystuje systemy cytometrii przepływowej FC 500 wyposażone w oprogramowanie systemowe CXP do badania próbek.

ZASADA DZIAŁANIA

Test ten zależy od zdolności przeciwciała monoklonalnego do wiązania powierzchni komórek wykazujących ekspresję oddzielnych determinant antygenowych. Odczynnik CD45-FITC/CD34-PE w zestawie odczynników Stem-Kit jest połączeniem dwóch mysich przeciwciał monoklonalnych; każde jest sprzężone ze swoistym fluorochromem i swoiste wobec innego antygenu powierzchniowego komórki. Swoiste barwienie powierzchni komórki osiąga się inkubując w powtórzeniu próbkę biologiczną z dwubarwnym odczynnikiem CD45-FITC/CD34-PE.

Dodatkowy test tej samej próbki jest barwiony za pomocą odczynnika CD45-FITC / IsoClonic Control-PE w celu sprawdzenia nieswoistego wiązania przeciwciała monoklonalnego CD34-PE. 7-AAD Viability Dye, barwnik kwasu nukleinowego, który wiąże dostępne pary zasad (komórkowy DNA), służy do rozróżniania komórek żywych od nieżywych. Krwinki czerwone w każdej próbce są poddawane lizie przy użyciu roztworu NH₄Cl Lysing Solution przygotowanego jako stężenie 1X. Dodawane są fluorokulki Stem-Count Fluorospheres lub Flow-Count Fluorospheres (odczynnik liczby bezwzględnej), a pozostałe komórki są analizowane przy użyciu cytometrii przepływowej. Kontrole procesu i kontrole jakości oznaczenia są zapewniane dzięki odczynnikom do kontroli jakości analizatora i próbki: fluorokulki Flow-Check Fluorospheres, fluorokulki Flow-Set Fluorospheres, odpowiednie odczynniki kompensacyjne i komórki kontrolne Stem-Trol Control Cells.

PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ KLINICZNYCH

Raporty naukowe chronologii hematopoetycznych komórek progenitorowych (HPC) wskazują, że wczesne badania opierały się na liczeniu komórek jądrzastych. Kolejne badania obejmujące testy jednostek tworzących kolonie (CFU) zapewniały zgrubne przybliżenia populacji komórek progenitorowych. Po intensywnych czasowo testach CFU nastąpiło odkrycie cząsteczki powierzchniowej komórki CD34. Okazało się, że CD34 występuje na powierzchni wczesnych komórek hematopoetycznych i tworzących kolonie komórek hematopoetycznych w szpiku kostnym i krwi obwodowej (20). Następnie opracowano przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko cząsteczce CD34 i stosowano je w cytometrii przepływowej. Oznaczanie CD34 za pomocą cytometrii przepływowej jest obecnie szeroko uznawane za sposób oceny hematopoetycznych komórek progenitorowych i macierzystych.

W szpiku kostnym osób zdrowych od 1 do 3% komórek wykazujących ekspresję antygenu CD34 jest zdolne do przywrócenia długoterminowej hematopoezy wielu linii (3, 20). We krwi obwodowej osób zdrowych mniej niż 0,1% krążących krwinek wykazuje ekspresję antygenu CD34 (1, 21). Stosowanie odczynników Stem-Kit zapewnia prostą, szybką i czułą metodę cytometrii przepływowej do liczenia hematopoetycznych komórek progenitorowych i macierzystych we krwi obwodowej, produktach leukoferezy, szpiku kostnym i krwi pępowinowej.

SKŁAD ODCZYNNIKA

Odczynniki Stem-Kit zawierają:

- Odczynnik CD45-FITC/CD34-PE (45/34) — 1 fiołka.
- Odczynnik CD45-FITC/IsoClonic Control-PE (45/CTRL) — 1 fiołka.
- Fluorokulki Stem-Count — 1 fiołka.
- 7-AAD Viability Dye — 1 fiołka.
- 10X NH₄Cl Lysing Solution — 2 fiołki.

1. Odczynniki te muszą być stosowane jako zestaw, tak jak je dostarczono w zestawie.

Fluorokulki Flow-Count, które są równoważne fluorokulkom Stem-Count, mogą być używane do oznaczania liczby bezwzględnej, jeżeli stosowane jest swoiste stężenie oznaczone.

2. CD45-FITC/CD34-PE to gotowy do użycia odczynnik dwubarwny dostarczony w 2,2 mL soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) zawierający 2 mg/mL albuminy surowicy bydlęcej (BSA) i 0,1% azydku sodu jako środek konserwujący.
3. CD45-FITC/IsoClonic Control-PE to gotowy do użycia odczynnik dwubarwny dostarczony w 1,2 mL PBS zawierający 2 mg/mL BSA i 0,1% azydku sodu jako środek konserwujący. Odczynnik CD45-FITC/IsoClonic Control-PE to mieszanina niesprzężonego i sprzężonego z PE przeciwciała monoklonalnego 581 (identycznego z CD34). Mieszanina działa także jako odpowiednia, izomorfologiczna kontrola do sprawdzania nieswoistego wiązania CD34-PE mAb na każdej z próbek.

UWAGA: Odczynników CD45-FITC/CD34-PE i CD45-FITC/IsoClonic Control-PE nie należy rozdzielać. Podczas wykonywania testów i kontroli należy zachować ostrożność, aby oba odczynniki miały taki sam numer serii na etykiecie fiołki.

Podsumowanie charakterystyki przeciwciał

Swoistość	CD45	CD34
Klon	J33	581
Hybrydoma	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Łańcuch Ig	IgG1, łańcuchy lekkie κ	IgG1, łańcuchy lekkie κ
Gatunek	Mysz	Mysz
Koniugacja	Izotiocyanian fluoresceiny (FITC)	R-fikoerytryna (PE)
Stosunek molowy	5–8 moli FITC/mol Ig	0,5–1,5 mola PE/mol Ig
Światło wzbudzenia	488 nM (niebiesko-zielony)	488 nM (niebiesko-zielony)
Emisja fluorescencji	od 504 do 541 nm (głównie zielony)	Od 568 do 590 nm (głównie pomarańczowy)

4. Fluorokulki Stem-Count lub Flow-Count zawierają 10 µm (średnica nominalna) mikrosfery fluorescencyjnego polistyrenu w 20 mL zawiesiny wodnej pożywki zawierającej środek powierzchniowo czynny i 1% formaldehyd. Każda fluorokulka zawiera barwnik o zakresie emisji fluorescencji od 525 nm do 700 nm przy długości fali wzbudzenia 488 nm. Oznaczone stężenie fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count (fluorokulki/µL) uzyskano mnożąc wiele analiz powtórzonych przy użyciu analizatora wielkości cząstek COULTER. Wartość właściwą dla serii podano na etykiecie fiolki.
5. Barwnik 7-AAD Viability Dye jest dostarczany w 99% soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS: 0,01 M fosforanu sodu, 0,145 M chlorku sodu, pH 7,2) z 1% dimetylosulfotlenku (DMSO).
6. Odczynnik NH₄Cl Lysing Solution jest dostarczany jako 10X stężony roztwór 20 mL. Zawiera on mieszaninę chlorku amonu (NH₄Cl), wodorowęglanu potasu (KHCO₂), kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA).

OSTRZEŻENIE I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Preparaty przeciwciała monoklonalnego zawierają 0,1% azydku sodu. W środowisku kwaśnym azydek sodu wchodzi w reakcję, w wyniku której powstaje silnie toksyczny związek — kwas azotowodorowy. Utylizacji do systemów kanalizacji powinny towarzyszyć duże ilości bieżącej wody, aby uniknąć niebezpiecznego nagromadzenia się w rurach metalowych i potencjalnych wybuchów.
2. Wszystkie próbki, preparaty i materiały wchodzące w kontakt z nimi należy traktować jako potencjalne źródło zakażenia i utylizować z zachowaniem stosownych środków ostrożności.
3. Nigdy nie pipetować ustami i unikać kontaktu próbek lub odczynników ze skórą oraz błonami śluzowymi.
4. Nie używać odczynników po upływie daty przydatności do użytku podanej na etykiecie fiolki.
5. Fluorokulki Stem-Count lub Flow-Count zawierają 1% formaldehydu. Należy unikać kontaktu ze skórą i oczami, ponieważ formaldehyd może mieć nieodwracalny wpływ na te tkanki. Nie wdychać oparów. Nosić odpowiednie środki ochrony, takie jak rękawice i okulary ochronne.
6. Podczas przechowywania lub stosowania odczynników Stem-Kit nie należy narażać na działanie silnego światła lub ciepła.
7. Unikać parowania i wycieku fluorokulek Stem-Count lub fluorokulek Flow-Count, gdyż mogą wystąpić błędne wyniki. Po użyciu szczelnie zamknąć fiolki i przechowywać je w pozycji pionowej.
8. Przed użyciem należy się upewnić, że wszystkie fluorokulki ponownie uległy zawieszeniu. Unikać zbyt intensywnego mieszania, aby zminimalizować powstawanie pęcherzyków powietrza. Nie pobierać pipetą pęcherzyków powietrza, gdyż może to spowodować uzyskanie błędnych wyników.
9. Użyć kalibrowanej pipety (najlepiej pipety z dodatnim wypieraniem lub pipety powtarzalnej) w celu dozowania próbek i fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count. W przeciwnym razie uzyskane wyniki mogą być błędne.
10. Stosować techniki pipetowania zalecane przez producenta pipety, aby zapewnić dokładne i precyzyjne pipetowanie próbki i fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count. W przeciwnym razie uzyskane wyniki mogą być błędne.
11. Wybarwione i poddane lizie próbki muszą być przechowywane na lodzie i badane w cytometrze przepływowym zgodnie z informacjami w sekcji „Stabilność przetworzonej próbki”, a w przypadku innego postępowania mogą wystąpić błędne wyniki.
12. Upewnić się, że zliczono co najmniej 1000 fluorokulek Stem-Count lub fluorokulek Flow-Count, gdyż w przeciwnym razie nie nastąpi automatyczna konwersja wyników na liczby bezwzględne.
13. Każda partia fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count charakteryzuje się swoistym stężeniem fluorokulek. Określając wyniki dla liczby bezwzględnej, należy pamiętać o użyciu prawidłowej wartości stężenia oznaczonego.
14. Nie należy stosować metod przygotowania wymagających etapu przemywania ze względu na nieznane utraty komórek.

15. Stosowanie czasów inkubacji lub mieszania bądź temperatur innych niż określone może spowodować uzyskanie błędnych wyników.
16. Barwnik 7-AAD Viability Dye zawiera 0,005% 7-AAD. Czysty 7-AAD to potencjalna substancja rakotwórcza. Chociaż ten związek jest wysoce rozcieńczony, zaleca się unikanie kontaktu ze skórą i oczami, noszenie odpowiedniej odzieży ochronnej i rękawic oraz odpowiedniej ochrony oczu/twarzy.
17. Barwnik 7-AAD Viability Dye zawiera 1% dimetylosulfotlenku (DMSO). Czysty DMSO ma działanie drażniące. Chociaż ten związek jest rozcieńczony, zaleca się unikanie kontaktu ze skórą i oczami, noszenie odpowiedniej odzieży ochronnej i rękawic oraz odpowiedniej ochrony oczu/twarzy.
18. Jako chromofor, barwnik 7-AAD jest wrażliwy na światło. Przechowywać barwnik 7-AAD Viability Dye w jego kartonowym opakowaniu, aby uniknąć ciągłego narażenia na światło podczas przechowywania.
19. Podczas inkubacji należy zminimalizować narażenie mieszanych próbek na światło.
20. Podczas pracy z odczynnikami należy stosować ogólne zasady dobrej praktyki laboratoryjnej.

KLASYFIKACJA ZAGROŻEŃ WG GHS

Stem-Count fluorokulki

NIEBEZPIECZEŃSTWO



H316	Działa umiarkowanie drażniąco na skórę.
H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
H350	Może powodować raka.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P280	Stosować rękawice ochronne, odzież ochronną i ochronę oczu/ochronę twarzy.
P308+P313	W przypadku narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P333+P313	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P362+P364	Zdjąć zanieczyszczoną odzież i wyprać przed ponownym użyciem.
	Formaldehyd 0,5 - 1,0% masa poreakcyjna: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [nr WE 247-500-7] i 2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [nr WE 220-239-6] (3:1) < 0,05%

7-AAD barwnik określający żywotność

UWAGA

H316	Działa umiarkowanie drażniąco na skórę.
P332+P313	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
	Dimetylosulfotlenek 0,5 - 2%



Karta charakterystyki jest dostępna pod adresem beckman.com/techdocs

WARUNKI PRZECZOWYWANIA I STABILNOŚĆ

Nieotwarty odczynnik jest stabilny do upływu daty ważności podanej na fiolce pod warunkiem przechowywania w temperaturze 2–8°C w ciemności. Nie używać po upływie daty ważności. Produktu nie należy zamrażać. Odczynniki Stem-Kit są stabilne przez 30 dni od otwarcia fiolki fluorokulek Stem-Count lub fluorokulek Flow-Count. Otwarte fiolki muszą być ponownie

zamknięte bezpośrednio po użyciu i przechowywane w temperaturze 2–8°C w ciemności. NIE dzielić na porcje fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count z ich oryginalnej fiolki.

WAŻNE: Wyciek fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count grozi uzyskaniem błędnych wyników. Po otwarciu fluorokulki Stem-Count lub Flow-Count należy przechowywać w pozycji pionowej, aby zapobiec wyciekowi. W przypadku stwierdzenia oznak przecieku, odczynników nie należy używać.

Dowody pogorszenia jakości

Oznaki pogorszenia jakości mogą wystąpić w następujących sytuacjach:

Odczynniki Stem-Kit, z wyjątkiem fluorokulek Stem-Count

- Zmiana prawidłowego wyglądu, taka jak wymieniona poniżej

Odczynnik	Wygląd prawidłowy
CD45-FITC / CD34-PE	Przezroczysty, lekko różowy płyn
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Płyn przezroczysty do lekko różowego
7-AAD barwnik określający żywotność	Przezroczysty płyn o barwie lekko różowej do czerwonej
NH ₄ Cl Lysing Solution	Przezroczysty, bezbarwny płyn

Stem-Count Fluorospheres

- Wygląd, podczas akwizycji, drugorzędowych populacji fluorescencyjnych zawierających ponad 20% całkowitej populacji fluorokulek.
- Duża zmienność wartości uzyskanych dla liczb lub próbek.

WAŻNE: Odczynniki nie powinny być używane, jeżeli występują dowody pogorszenia jakości, ponieważ można uzyskać nieprawidłowe wyniki. Jeżeli występują dowody pogorszenia jakości, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Beckman Coulter.

Przygotowanie odczynnika

- Dwubarwne odczynniki CD45-FITC/CD34-PE i CD45-FITC/IsoClonic Control-PE są stosowane bezpośrednio z fiolek bez żadnego rozcieńczania.
- Fluorokulki Stem-Count lub Flow-Count są stosowane bezpośrednio z fiolki bez żadnego rozcieńczenia. Podczas pierwszego otwierania należy usunąć dokładnie folię aluminiową (zgrzew) u góry butelki. Wymagane jest prawidłowe mieszanie. Podczas pierwszej pracy z fiolką fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count na początku dnia, worteksować przez 3–5 sekund.

Przed pipetowaniem fiolki delikatnie wytrząsać odwracając fiolkę 3–5 razy.

Po wstępnym worteksowaniu na początku dnia, zwrócić fiolkę z fluorokulkami do temperatury 2–8°C do momentu użycia.

Unikać parowania i wycieku szczelnie zamykając fiolkę po użyciu.

- Barwnik 7-AAD Viability Dye jest stosowany bezpośrednio z fiolki bez żadnego rozcieńczania.
- Odczynnik 1X NH₄Cl Lysing Solution musi być przygotowywany codziennie: dodać dziewięć objętości wody dejonizowanej do jednej objętości 10X stężonego odczynnika NH₄Cl Lysing Solution. Nie schładzać. Odrzucić nieużyty odczynnik 1X NH₄Cl Lysing Solution na koniec dnia.

Przed użyciem doprowadzić wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (18–25°C).

POSTĘPOWANIE Z PRÓBKĄ

Wymagania dotyczące próbki

Podsumowanie postępowania z próbkami:

Typ próbki	Metoda bramkowania	Temperatura przechowywania	Wiek próbki
Afereza	Algorytm	2–8°C	24 godziny
	Ręcznie	2–8°C	24 godziny
Szpik kostny	Algorytm	2–8°C	24 godziny
	Ręcznie	2–8°C	24 godziny
Krew pępowinowa	Algorytm	18–25°C	24 godziny
	Ręcznie	18–25°C	24 godziny
Prawidłowa krew pełna	Algorytm	18–25°C	20 godzin
	Ręcznie	18–25°C	20 godzin

Mobilizowana krew pełna	Algorytm	18–25°C	20 godzin
	Ręcznie	18–25°C	20 godzin

1. Próbkę biologiczną obejmują świeżą prawidłową lub mobilizowaną obwodową krew pełną oraz świeże lub rozmrażane produkty aferezy, krew pępowinową i szpik kostny.
2. Manipulowane lub oczyszczone progenitorowe komórki hematopoetyczne (HPC) mogą być analizowane wyłącznie metodą bramkowania ręcznego.
3. Pobrać produkty aferezy, próbki krwi obwodowej, próbki krwi pępowinowej lub próbki szpiku kostnego aseptycznie do jałowej, pustej probówki do pobierania krwi z antykoagulantem ACD skład A lub K3 EDTA.
4. Próbkę krwi pełnej lub mobilizowanej krwi pełnej pobrane do probówek z antykoagulantem mogą być przed barwieniem przechowywane przez maksymalnie 20 godzin w temperaturze pokojowej (18–25°C).
5. Próbkę krwi pępowinowej pobrane do probówek z antykoagulantem mogą być przed barwieniem przechowywane przez maksymalnie 24 godziny w temperaturze pokojowej (18–25°C).
6. Pobrane produkty aferezy i materiał szpiku kostnego można przed barwieniem przechowywać przez okres do 24 godzin w temperaturze 2–8°C.
7. Przed przygotowaniem próbki należy upewnić się, że stężenie krwinek białych (WBC) nie przekracza 30×10^9 komórek WBC/L. W razie potrzeby rozcieńczyć próbkę HBSS lub równoważnikiem, aby osiągnąć wartość średnią 15×10^9 komórek WBC/L. Zarejestrować współczynnik rozcieńczenia do obliczenia końcowej liczby bezwzględnej HPC.
8. Niskie stężenia białka mogą prowadzić do zlepiania fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count dając błędnie wysokie liczby bezwzględne komórek. Rozcieńczenie próbek o niskim stężeniu białka należy przeprowadzić przy użyciu buforu wzbogaconego w białko.
9. Wszystkie próbki powinny być przetwarzane z odczynnikami Stem-Kit, w tym barwnik 7-AAD Viability Dye.

Procedura przygotowania próbki

Przeprowadzić testy w powtórzeniu zgodnie z publikacją „The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry” (Wytyczne ISHAGE dotyczące oznaczania komórek CD34+ metodą cytometrii przepływowej) (1).

UWAGA: W przypadku przetwarzania komórek kontrolnych Stem-Trol, pełne instrukcje dotyczące metody ręcznej można znaleźć w ulotce dołączonej do opakowania Stem-Trol. Pełne instrukcje dotyczące metody analizy automatycznej można znaleźć w „stemONE System Guide” (Przewodniku systemu stemONE) dostarczonym z oprogramowaniem systemu stemONE lub w „stemCXP System Guide” (Przewodniku systemu stemCXP) dostarczonym z oprogramowaniem systemu stemCXP.

1. Dla każdej próbki należy następująco oznaczyć trzy probówki:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipetować 20 µL odczynnika CD45-FITC/CD34-PE do probówek: 45/34/7-AAD #1 oraz 45/34/7-AAD #2.
3. Pipetować 20 µL odczynnika CD45-FITC/IsoClonic Control-PE do probówki: 45/CTRL/7-AAD.
4. Pipetować do wszystkich probówek 20 µL barwnika 7-AAD Viability Dye.

WAŻNE: Jeżeli próbka krwi pozostaje na górze lub ścianie probówki testowej, istnieje ryzyko niepełnej lizy. Zachować ostrożność podczas pipetowania, aby nie dopuścić do dotknięcia przez krew góry lub ścianek probówki testowej. W razie potrzeby oczyścić probówkę wacikiem bawełnianym, aby usunąć wszystkie ślady próbki krwi z góry i ścianek probówki testowej.

5. Używając pipety z dodatnim wypieraniem lub pipety powtarzalnej, pipetować 100 µL próbki pacjenta do probówki.
6. Natychmiast wymieszać zawartość probówki mikserem Vortex przez 5 sekund.
7. Inkubacja wszystkich probówek w temperaturze pokojowej (18–25°C) przez 20 minut, z zapewnieniem ochrony przed światłem.
8. Po inkubacji dodać 2 mL przygotowanego roztworu 1X NH₄Cl Lysing Solution do każdej probówki i natychmiast worteksować przez 5 sekund.

UWAGA: Szczegóły przygotowywania odczynnika Lysing Solution, patrz punkt 7.2 powyżej — PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKA.

WAŻNE: Jeżeli podczas pipetowania występują pęcherzyki powietrza, istnieje ryzyko uzyskania błędnych wyników. Nadmierne mieszanie fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count może spowodować powstanie pęcherzyków powietrza. Nie należy nadmiernie mieszać fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count i nie należy pipetować pęcherzyków powietrza do probówek z próbkami.

9. Inkubacja w temperaturze pokojowej przez 10 minut, z zapewnieniem ochrony przed światłem.
10. Delikatnie wymieszać fluorokulki Stem-Count lub Flow-Count odwracając fiolkę od 3 do 5 razy przed użyciem.
11. Przed akwizycją i natychmiast po etapie 9, używając pipety z dodatnim wypieraniem lub pipety powtarzalnej, pipetować 100 µL fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count do każdej z trzech probówek.
12. Natychmiast worteksować każdą probówkę przez 5 sekund.

UWAGA: Szczegóły przygotowywania odczynnika Lysing Solution, patrz punkt 7.2 powyżej — **PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKA.**

Podsumowanie barwienia próbki

Odczynniki/Próbki	45/34/7-AAD #1	Etykieta probówki testowej 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD barwnik określający żywotność	20 µL	20 µL	20 µL
Próbka	100 µL	100 µL	100 µL
Worteksować — Inkubować w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Chronić przed światłem.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Worteksować — Inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Chronić przed światłem.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Wytrząsanie			
Pobranych produktów aferezy, próbek krwi pępowinowej i próbek szpiku kostnego nie należy pozostawiać na więcej niż 60 minut na lodzie przed akwizycją.			
Próbek krwi pełnej i mobilizowanej krwi pełnej nie należy pozostawiać na więcej niż 45 minut na lodzie przed akwizycją.			
Natychmiast badać rozmrożone próbki.			
Chronić przed światłem			

Stabilność przetworzonej próbki:

- Po dodaniu fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count do pobranych produktów aferezy, próbek krwi pępowinowej i próbek szpiku kostnego nie należy pozostawiać próbek na więcej niż 60 minut na lodzie przed akwizycją.
- Po dodaniu fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count do próbek krwi pełnej i próbek mobilizowanej krwi pełnej nie należy pozostawiać próbek na więcej niż 45 minut na lodzie przed akwizycją.
- W przypadku próbek zamrożonych akwizycję należy wykonać natychmiast po dodaniu fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count.
- Przetworzone próbki muszą być przechowywane na lodzie chronionym przed światłem, a podczas akwizycji należy w jak największym stopniu ograniczać narażenie tych próbek na temperaturę pokojową.

ZAWARTOŚĆ

Środek konserwujący, azydek sodu, może tworzyć związki wybuchowe w metalowych rurach kanalizacyjnych. Patrz NIOSH Bulletin (Biuletyn instytutu NIOSH): Explosive Azide Hazard (Niebezpieczeństwo wybuchu azydku) (16.8.76). Po usunięciu nierozcieńczonego odczynnika należy przepłukać rury ściekowe wodą, aby uniknąć gromadzenia się azydków. Azydek sodu musi być usuwany zgodnie z odpowiednimi przepisami lokalnymi.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE Z ZESTAWEM:

- Woda dejonizowana.
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) lub równoważny
- Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
- Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)

5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Jako alternatywa do fluorokulek Stem-Count Fluorospheres: fluorokulki Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
9. Łaźnia lodowa
10. Probówki testowe plastikowe (12 x 75 mm)
11. Kalibrowana pipeta powtarzalna (20 μ L, 100 μ L, 2 mL) i końcówki lub kalibrowana pipeta z dodatnim wypieraniem (20 μ L, 100 μ L, 2 mL) oraz końcówki
12. Standardowe kalibrowane pipety (20 μ L, 100 μ L, 2 mL) z końcówkami.
13. Mikser Vortex.
14. Zegar.
15. Cytometr przepływowy.
16. Zestaw oprogramowania stemCXP 2.0, wersja 2.0 stemCXP, WIN 7, WYŁĄCZNIE do automatycznej analizy próbek na systemie cytometru przepływowego FC 500 wyposażonym w oprogramowanie CXP (wersja 2.0).

WYNIKI

Konfiguracja protokołu analizy

Cytometr przepływowy musi być wyposażony w możliwość detekcji rozpraszania do przodu, rozpraszania bocznego oraz czterech kanałów fluorescencji. Dla kanału FL3 (do monitorowania wartości Stem-Count lub fluorokulek Flow-Count) użyć filtra środkowoprzepustowego 620 nm. Dla kanału FL4 (do monitorowania barwnika żywotności 7-AAD) użyć filtra długich częstotliwości 675 nm.

Upewnić się, że cytometr przepływowy jest prawidłowo wyrównany i wzorcowany dla intensywności fluorescencji.

9.2.3 Upewnij się, że cytometr przepływowy jest właściwie wyregulowany do kompensacji fluoroscencyjnej.

UWAGA: W przypadku analizy próbki, wszystkie pozycje regionu są przybliżane do końca akwizycji próbki 45/34/7-AAD #1. Regiony są optymalizowane według następującego protokołu, a następnie NIE są regulowane dla drugiej i trzeciej próbki w panelu.

W celu analizy próbki należy przestrzegać serii 8 histogramów i schematu bramkowania (patrz niżej). Ta sama seria 8 histogramów i schemat bramkowania muszą być przestrzegane podczas stosowania komórek kontrolnych CD34+. Regiony A, B, C i D (definicja regionu, patrz nagłówki „Tworzenie regionu”) należy adaptować, aby uwzględniły charakterystyczny klaster komórek kontrolnych CD34+.

Tworzenie histogramu:

Utworzyć histogramy w następujący sposób:

1. Utworzyć Histogram 1 jako FL1 CD45-FITC wobec rozpraszania bocznego.
2. Utworzyć Histogram 2 jako FL2 CD34-PE wobec rozpraszania bocznego.
3. Utworzyć Histogram 3 jako FL1 CD45-FITC wobec rozpraszania bocznego.
4. Utworzyć Histogram 4 jako rozpraszanie do przodu wobec rozpraszania bocznego.
5. Utworzyć Histogram 5 jako FL1 CD45-FITC wobec FL2 CD34-PE.
6. Utworzyć Histogram 6 jako rozpraszanie do przodu wobec rozpraszania bocznego.
7. Utworzyć Histogram 7 jako czas wobec fluorokulek FL3 Stem-Count lub Flow-Count.
8. Utworzyć Histogram 8 jako FL4 7-AAD Viability Dye wobec rozpraszania bocznego.

Histogramy od 1 do 4 są przeznaczone do charakteryzowania CD34+ HPC; proces ten można opóźnić do etapu analizy. Te pierwsze cztery histogramy są skonfigurowane zgodnie z publikacją „The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry” (Wytyczne ISHAGE dotyczące oznaczania komórek CD34+ metodą cytometrii przepływowej) (1, 2). Histogramy od 5 do 7 są przeznaczone do monitorowania parametrów, które są ważne podczas etapu akwizycji. Obejmują one dyskryminator rozpraszania do przodu, liczbę zdarzeń CD45+ do zebrania i prawidłowej akumulacji singletów fluorokulki.

Histogram 8 jest przeznaczony do odróżniania i analizowania zdarzeń żywotnych od nieżywotnych.

Tworzenie obszarów

Stwórz następujące obszary:

1. Histogram 1 — Utworzyć prostoliniowy Region A na Histogramie 1, aby uwzględnić wszystkie leukocyty CD45+ i wyeliminować płytki krwi, pozostałości krwinek czerwonych i agregaty.
2. Histogram 1 — Utworzyć amorficzny Region E na Histogramie 1, aby uwzględnić limfocyty (jaskrawe CD45, niskie rozpraszanie boczne).
3. Histogram 2 — Utworzyć prostokątny Region B na Histogramie 2, aby uwzględnić wszystkie zdarzenia CD34+. Ustawić zatrzymanie liczenia na 75 000 zdarzeń (zdarzenia CD45+) dla Histogramu 2.
4. Histogram 3 — Utworzyć amorficzny Region C na Histogramie 3, aby włączyć wszystkie zgrupowane zdarzenia CD45dim.
5. Histogram 4 — Tworzenie amorficznego regionu D na Histogramie 4 w celu uwzględnienia wszystkich grupowanych zdarzeń z pośrednim rozpraszaniem bocznym i pośrednim do wysokiego rozpraszaniem do przodu.
6. Histogram 5 — Tworzenie regionu I Quadstat na Histogramie 5 w celu weryfikacji dolnej granicy ekspresji CD45 na zdarzeniach CD34+.
7. Histogram 5 — Utworzyć amorficzny Region H na Histogramie 5, aby otaczał wszystkie fluorokulki Stem-Count lub Flow-Count, w tym dublety. Region H powinien znajdować się w prawym górnym rogu Histogramu 5.

UWAGA: Upewnić się, że Region H jest rysowany jako region AMORPHOUS (AMORFICZNY).

8. Histogram 5 — Utworzyć prostokątny Region K (nazwanego „listgate –”) na Histogramie 5. Ustawić granice Regionu K na pierwszej dekadzie logarytmu histogramu dwuparametrowego. Ten region K umożliwia eliminację zdarzeń podwójnie ujemnych podczas akwizycji w celu analizowania 75 000 istotnych zdarzeń CD45+.
9. Histogram 6 — Kopiowanie regionu D z Histogramu 4 jako Region F na Histogramie 6.
10. Histogram 7 — Utworzyć prostoliniowy Region G na Histogramie 7, aby zawierał tylko singlety fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count. Region G można opisać jako „CAL”, aby umożliwić automatyczne obliczanie liczb bezwzględnych CD34+ HPC (dodatkowe szczegóły, patrz podręcznik analizatora).
11. Histogram 8 — Utworzyć prostokątny Region J na Histogramie 8, aby uwzględnić wszystkie żywotne leukocyty (zdarzenia ujemne 7-AAD Viability Dye).

Tworzenie bramki

Utwórz bramki w następujący sposób:

1. Histogram 1 — Przypisać „J” do Histogramu 1, aby wyświetlić wszystkie żywotne zdarzenia. Jeżeli nie jest stosowany barwnik 7-AAD, należy przypisać region „H” do Histogramu 1, aby wyświetlić wszystkie zdarzenia wykluczając fluorokulki Stem-Count lub Flow-Count, w tym dublety.
2. Histogram 2 — Przydzielić „AJ” („A”, jeżeli nie jest używany barwnik 7-AAD) do Histogramu 2, aby wyświetlić żywotne (całkowite, jeżeli nie jest używany barwnik 7-AAD) zdarzenia CD34+.
3. Histogram 3 — Przydzielić „A” i „B” i „J” („A” i „B”, jeżeli nie jest używany barwnik 7-AAD) do Histogramu 3, aby wyświetlić żywotne (całkowite, jeżeli nie jest używany barwnik 7-AAD) zdarzenia CD45+/CD34+.
4. Histogram 4 — Przydzielić „A” i „B” i „C” i „J” („A” i „B” i „C”, jeżeli nie jest używany barwnik 7-AAD) do Histogramu 4, aby wyświetlić żywotne (całkowite, jeżeli nie jest używany barwnik 7-AAD) zgrupowane zdarzenia CD45+/CD34+ z niskim rozpraszaniem bocznym przy wykluczeniu płytek krwi i zanieczyszczeń. Zdarzenia z regionu ABCDJ są rzeczywistymi żywotnymi CD34+ HPC.
5. Histogram 5 — Bez bramkowania w celu wyświetlenia wszystkich zdarzeń.
6. Histogram 6 — Przydzielić „EJ” („E”, jeżeli nie jest używany barwnik 7-AAD) do Histogramu 6, aby wyświetlić żywotne (całkowite, jeżeli nie jest używany barwnik 7-AAD) limfocyty jako wizualną kontrolę dyskryminatora.
7. Histogram 7 — Przypisać „H” do Histogramu 7, aby wyświetlić wszystkie fluorokulki Stem-Count lub Flow-Count, w tym dublety.
8. Histogram 8 — Przypisać „A” do histogramu 8, aby wyświetlić zdarzenia CD45+.

Ustawienia cytometrii przepływowej

1. Zweryfikować, czy cytometr przepływowy jest prawidłowo wyrównany i zoptymalizowany do rozpraszania światła i intensywności fluorescencji detektorów FL1, FL2, FL3 oraz FL4 zgodnie z wytycznymi producenta i laboratoryjnymi. Zweryfikować, czy kompensacja koloru jest ustawiona dla pracy standardowej. Dodatkowe instrukcje, patrz podręcznik analizatora.
2. Worteksować próbki testowe przez 5 sekund.
3. Przeprowadzić akwizycję danych na cytometrze przepływowym. Musi być przeanalizowane co najmniej 75 000 zdarzeń CD45+.
4. W przypadku analizy próbek: Dostosować dyskryminator i regiony analizując próbkę 45/34/7-AAD #1. Zapisać protokół i analizować próbki 45/34/7-AAD #2 i 45/CTRL/7-AAD bez dalszych korekt.

Przykład analizy

Histogramy przedstawione w ZAŁĄCZNIKU są wyświetlane w kolejności, tak jak wyświetlane w protokole.

Obliczanie CD34+ HPC dla próbki

Liczba CD34+ HPC jest obliczana jako średnia wyników statystycznych regionu D dla dwóch próbek powtórzeń (tj. 45/34/7-AAD #1 i 45/34/7-AAD #2).

Wyniki CD34+ HPC są uznawane za ważne, jeżeli wyniki uzyskane przez odczynnik CD45-FITC/IsoClonic Control-PE są mniejsze niż 10% wyników CD34+ HPC.

1. Średnia wyników uzyskanych z próbek 45/34/7-AAD #1 i 45/34/7-AAD #2 dla każdej próbki (tj. średnia wyników wydruków statystyki regionu D). Liczba CD34+ HPC może wypadać w zakresie 10% średniej dla próbek duplikatów. Wartość uzyskana z próbki kontrolnej 45/CTRL/7-AAD musi stanowić poniżej 10% wartości średniej uzyskanej z próbek testowych w celu walidacji wyników

UWAGI: Jeżeli średnia dla liczby bezwzględnej uzyskanej dla duplikatu CD34+ HPC wypada poza zakresem dopuszczalnym (tj. przekracza 10%), należy określić, czy prawidłowo przeprowadzono pipetowanie, zwłaszcza dla fluorokulek Stem-Count lub fluorokulek Flow-Count. Sprawdzić wzrokowo raporty cytometru przepływowego i jakość barwienia oraz proces lizy w próbkach testowych. Zweryfikować sposób ustalenia granic regionu.

Jeżeli wartość uzyskana z 45/CTRL/7-AAD wypada poza zakresem wartości dopuszczalnych (tj. przekracza 10% liczby bezwzględnej średniej uzyskanej dla duplikatu), określić, czy pipetowanie przeprowadzono prawidłowo, zwłaszcza w przypadku fluorokulek Stem-Count lub Flow-Count. Sprawdzić wzrokowo raporty cytometru przepływowego i jakość barwienia oraz proces lizy w próbkach testowych. Zweryfikować sposób ustalenia granic regionu.

W razie potrzeby powtórzyć etap akwizycji z dodatkiem próbki BLANK po pierwszym powtórzeniu próbki 45/34/7-AAD #1 i #2 i przed próbą 45/CTRL/7-AAD. W razie potrzeby powtórzyć całe przygotowywanie z nowymi próbkami testowymi dodając próbkę BLANK. Dokonać akwizycji i analizować zarówno nowe, jak i poprzednie serie próbek. Porównać dwa wyniki. Jeżeli nie ma zgodności, skontaktować się z przedstawicielem firmy Beckman Coulter.

2. Jeżeli próbka była rozcieńczona, wynik uzyskany powyżej MUSI być pomnożony przez odpowiedni współczynnik rozcieńczenia (Dil). Uzyskany wynik końcowy to liczba bezwzględna CD34+ HPC (komórki/ μ L).

Liczba bezwzględna CD34+ HPC (komórki/ μ L) = wynik wydruku liczby bezwzględnej CD34+ HPC (komórki/ μ L) x Dil

3. W przypadku pakietów aferezy, całkowita liczba CD34+ HPC na pakiet może być obliczona przy użyciu następującego wzoru:

Całkowita liczba CD34+ HPC na opakowanie = liczba bezwzględna CD34+ HPC (komórki/ μ L) x 10^6 x objętość opakowania (L)

Gdzie:

4. Obliczanie odsetka wartości CD34+ HPC w leukocytach CD45+, patrz następujący wzór:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Liczba bezwzględna CD34+ HPC (komórki/ μ L)} \quad \text{(tj. wyniki wydruku regionu D)}}{\text{Liczba bezwzględna leukocytów CD45+ (komórki/ μ L)} \quad \text{(tj. wyniki wydruku regionu A)}} \times 100$$

KONTROLA JAKOŚCI

Upewnić się, że cytometr przepływowy jest prawidłowo wyrównany zgodnie z zaleceniami producenta opisanymi w podręcznikach analizatora. Intensywności docelowe ustalono w celu optymalizacji ustawień rozpraszania światła i fluorescencji analizatora dla analizowania próbek barwionych za pomocą odczynnika przeciwciała monoklonalnego CD45-FITC/CD34-PE i odczynnika CD45-FITC/IsoClonic Control-PE.

Fluorochromy izotiocyjanian fluoresceiny (FITC), fikoerytryna (PE) i barwnik 7-aminoaktynomycyna D (7-AAD) emitują światło o różnych długościach fali, ale mają pewne nałożenie zakresu widma, które należy skorygować za pomocą kompensacji elektronicznej. Optymalne poziomy kompensacji można ustalić za pomocą analizy, w histogramie dwuparametrowym, próbki krwi pełnej z dodanymi komórkami kontrolnymi Stem-Trol Control Cells barwionymi za pomocą barwnika 7-AAD Viability Dye i odpowiednich odczynników kompensacyjnych podczas stosowania oprogramowania CXP. Podczas analizy dokonywane

są regulacje w celu upewnienia się, że barwienie nie zachodzi w kwadrancie dwubarwnym z żadnym pojedynczym fluorochromem.

Barwnik 7-AAD Viability Dye (7-amino-aktynomycyna D) służy do identyfikacji komórek nieżywotnych przy użyciu analizy za pomocą cytometrii przepływowej, aby umożliwić liczenie interesujących żywotnych komórek. Barwnik jest wychwytywany przez komórki martwe (zdarzenia jaskrawe), które są następnie wykluczane z komórek żywotnych (zdarzenia ujemne) przez bramkowanie (patrz Histogram 8).

Przed analizowaniem próbek należy wybarwić oznaczoną kontrolę (komórki kontrolne Stem-Trol) w celu weryfikacji reaktywności przeciwciała.

WYDAJNOŚĆ

Podana charakterystyka wydajności opiera się na odczynnikach Stem-Kit stosowanych z cytometrem przepływowym COULTER EPICS XL/XL-MCL i oprogramowaniem System II. Przykłady wydajności na urządzeniu FC 500 z oprogramowaniem CXP, patrz „stemCXP System Guide” (Przewodnik systemu stemCXP).

Wartości spodziewane dla zakresów referencyjnych

Próbki prawidłowej krwi pełnej (n = 117) pobrano od grupy mężczyzn (n = 58) i kobiet (n = 59) w celu ustalenia prawidłowego zakresu referencyjnego. Niniejsze badanie przeprowadzono w zewnętrznym ośrodku oceniającym. Testy powtórzeń dla każdej próbki przeprowadzono zgodnie z ulotką dołączoną do odczynnika Stem-Kit. Bramkowanie ręczne i analizę przeprowadzono w celu uzyskania wartości % CD45+, CD34+ i CD34.

Analiza statystyczna sugeruje rozkład zebranych danych inny niż Gaussa. Na podstawie tych wyników do analizy danych zastosowano metodę nieparametryczną (solidną). Uzyskano wartości CD45+, CD34+ oraz CD34%. Wartości są wyrażone jako liczby bezwzględne (komórek/ μ L) dla CD45+ i CD34+ oraz odsetek całkowitej liczby leukocytów (CD34%), jak przedstawia to tabela poniżej.

Prawidłowa krew pełna: zakresy referencyjne

Metoda ręczna (analiza solidna)	n	CD45+ (komórki/ μ L)				CD34+ (komórki/ μ L)				CD34+ (%)			
		Min	Maks.	Średnia	SD	Min	Maks.	Średnia	SD	Min	Maks.	Średnia	SD
Ręcznie	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Wartości te są przeznaczone wyłącznie do celów poglądowych. Każde laboratorium powinno ustalić własne wartości oczekiwane z użyciem próbek reprezentatywnych dla lokalnej populacji zdrowych dawców.

Liniowość

Oznaczenia powtórzeń przeprowadzono z 10 rozcieńczeniami seryjnymi dla 2 rodzajów próbek: obwodowa krew pełna z dodanym CD34+ oraz świeża mobilizowana obwodowa krew pełna. Zakres dynamiczny od 0 do 2000 komórek/ μ L i dolny koniec zakresu czułości od 0 do 150 komórek/ μ L osiągnięto dla stężeń CD34+ HPC. Probki przygotowano według ulotki dołączonej do opakowania zestawu odczynników Stem-Kit i analizowano na cytometrze przepływowym COULTER EPICS XL/XL-MCL. Wartości są wyrażone jako liczby bezwzględne (komórek/ μ L). Wyniki analizowano jako analizy regresji liniowej dla oczekiwanych wobec uzyskanych liczb bezwzględnych dla średniej powtórzeń mniej endogennych komórek CD34+. Patrz tabele poniżej.

Nachylenia linii regresji podane z wykresami dla liczb bezwzględnych całkowitych CD34+ HPC pokazują matematyczną miarę liniowości. Jest to wspierane przez minimalny potencjalny błąd systematyczny oznaczenia wykazany przez przecięcia z osią y dla analiz. Oczekiwane liczby bezwzględne wykazują wysoką korelację z uzyskanymi liczbami bezwzględnymi.

Wyniki krwi pełnej z dodanym CD34+

Wykres, patrz Załącznik.

Wyniki krwi obwodowej (mobilizowanej)

Wykres, patrz Załącznik.

Dokładność metody (Tabele) (wyniki oczekiwane wobec uzyskanych)

Dokładność metody jest definiowana jako stopień zgodności między oczekiwanymi i uzyskanymi wynikami dla bramkowania zarówno ręcznego, jak i automatycznego oraz dla metod analizy. Świeża prawidłowa, obwodowa krew pełna z dodanymi oczyszczonymi komórkami CD34+ do poziomu 1875 komórek/ μ L. Liczby komórek potwierdzono za pomocą hematocytometru płytkowego Malassez i rozcieńczano seryjnie do różnych stężeń. Wyniki oczekiwane są porównywane z wynikami uzyskanymi dla średniej pomiarów powtarzanych przy użyciu bramkowania automatycznego i ręcznego oraz analizy dla każdego poziomu rozcieńczenia. Testowanie nachylenia i rzędnych przy przecięciu wykazuje brak różnicy statystycznej między bramkowaniem automatycznym i analizą oraz wynikami oczekiwanymi ani między bramkowaniem ręcznym i analizą oraz wynikami oczekiwanymi.

Dokładność metody — CD34+ (%)

Wykres, patrz Załącznik.

Dokładność metody — liczba bezwzględna CD34+ (komórek/ μ L)

Wykres, patrz Załącznik.

Dokładność metody — Leukocyty całkowite — CD45+ (komórki/ μ L)

Wykres, patrz Załącznik.

Dokładność metody (wyniki uzyskane przy zastosowaniu metody automatycznej wobec metody manualnej)

Stopień dokładności między metodami automatyczną i ręczną systemu stemONE badano w czterech zewnętrznych ośrodkach oceny wykorzystując świeżą obwodową krew pełną i świeże lub rozmrażane próbki aferezy, krwi pępowinowej oraz szpiku kostnego. Przedziały ufności (CI) obliczono z granicami 95%.

Świeże próbki obwodowej krwi pełnej (n = 59 z trzech ośrodków), świeżych produktów aferezy (n = 51 z trzech ośrodków), świeżej krwi pępowinowej (n = 29 z dwóch ośrodków), świeżego szpiku kostnego (n = 33 z dwóch ośrodków), rozmrażanych produktów aferezy (n = 23 z jednego ośrodka), rozmrażanej krwi pępowinowej (n = 31 z dwóch ośrodków) i rozmrażanego szpiku kostnego (n = 20 z jednego ośrodka) przygotowano według ulotki dołączonej do opakowania odczynników Stem-Kit i analizowano na cytometrach przepływowych COULTER EPICS XL/XL-MCL. Bramkowanie automatyczne i ręczne oraz analizę przeprowadzono w celu uzyskania wartości CD45+, CD34+ i CD34%.

Dokładność metod (ilustracje)

Świeże próbki obwodowej krwi pełnej (n = 59)

Wykres, patrz Załącznik.

Świeże próbki aferezy (n = 51)

Wykres, patrz Załącznik.

Świeże próbki krwi pępowinowej (n = 29)

Wykres, patrz Załącznik.

Świeże próbki szpiku kostnego (n = 33)

Wykres, patrz Załącznik.

Rozmrożone próbki aferezy (n = 23)

Wykres, patrz Załącznik.

Rozmrażane próbki krwi pępowinowej (n = 31)

Wykres, patrz Załącznik.

Rozmrożone próbki szpiku kostnego (n = 20)

Wykres, patrz Załącznik.

Precyzja

Precyzja międzylaboratoryjna

Badania przeprowadzono w ramach jednego ośrodka klinicznego przez trzech operatorów, z których każdy używał innego cytometru przepływowego. Zidentyfikowano trzy próbki reprezentujące zakres dynamiczny CD34+ (0–2000 komórek/ μ L):

- Zakres dolny: świeża, mobilizowana krew obwodowa
- Zakres środkowy: produkt aferezy
- Zakres górny: produkt aferezy

Próbki te podzielono na trzy porcje, jedną porcję dla każdego poziomu (niski, średni, wysoki) dostarczono każdemu z trzech operatorów. Próbkę przygotowano (n = 10) z każdej porcji według ulotki dołączonej do opakowania odczynników Stem-Kit. Każdy operator przeprowadził analizę na cytometrze przepływowym EPICS XL wykorzystując bramkowanie automatyczne i ręczne w celu uzyskania wartości CD45+, CD34+ i CD34%. Wartości są wyrażone jako procent (%) całkowitej liczby leukocytów oraz liczby bezwzględne (komórki/ μ L).

Wyniki badania precyzji międzylaboratoryjnej według poziomu podano w poniższych tabelach. Wartości uzyskane dla liczb bezwzględnych CD45+ i CD34+ oraz odsetek CD34 pokazują niewielką zmienność wykazaną przez średnie, odchylenia standardowe i współczynniki zmienności pomiarów powtórzeń.

Wykres, patrz Załącznik.

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna

Próbki obejmujące zakres dynamiczny oznaczenia uzyskano wykorzystując świeżą obwodową krew pełną, świeży szpik kostny oraz świeżą i rozmrażaną: aferezę i krew pępowinową z czterech zewnętrznych ośrodków oceny. Po dziesięć próbek przygotowano według ulotki dołączonej do opakowania zestawu odczynników Stem-Kit i analizowano na cytometrach przepływowych COULTER EPICS XL/XL-MCL wykorzystując bramkowanie ręczne i analizę w celu uzyskania wartości CD45+, CD34+ i CD34%.

Wartości dla CD45+, CD34+ i CD34% podane w kolejnych tabelach pokazują, że metoda analizy jest odtwarzalna, jak pokazują to średnie, odchylenia standardowe i współczynniki zmienności tych pomiarów. Tabele danych przedstawione w ZAŁĄCZNIKU pokazują precyzję międzylaboratoryjną oznaczenia.

Wykres, patrz Załącznik.

ORGANICZENIA

Ograniczenia w przypadku metody automatycznej zawiera stemCXP System Guide (Przewodnik systemu stemCXP) dostarczony z oprogramowaniem systemu stemCXP.

- Wybarwione i poddane lizie próbki muszą być przechowywane na lodzie i badane w cytometrze przepływowym zgodnie z informacjami w sekcji „Stabilność przetworzonej próbki”, a w przypadku innego postępowania mogą wystąpić błędne wyniki.
- Odczynników nie należy rozcieńczać, dzielić na porcje ani zamrażać. Stosować tylko tak, jak są zapakowane.
- Odczynniki są przeznaczone do stosowania wyłącznie w cytometrii przepływowej.
- W celu zapewnienia optymalnego barwienia należy rozmrozić próbki zamrożone.
- Wszystkie krwinki czerwone mogą nie ulegać lizie w następujących warunkach: obecność jądrzastych krwinek czerwonych, nieprawidłowe stężenie białka lub hemoglobinopatie. Może to spowodować fałszywie zaniżone wyniki CD34% z powodu nieulegających lizie krwinek czerwonych zliczanych jako leukocyty. Nie powinno to wpływać na liczby bezwzględne CD34+ i CD45+.
- Pewni pacjenci mogą stanowić szczególne problemy ze względu na zmienione lub bardzo niskie liczby pewnych populacji komórkowych.
- Jeżeli nieprawidłowo ustawiono bramki, wyniki uzyskane przy użyciu cytometrii przepływowej mogą być błędne.
- Odczynniki Stem-Kit są opracowane do stosowania barwnika 7-AAD Viability Dye do określania żywotnych komórek HPC. Jeżeli laboratorium wykorzystuje alternatywną metodę określania, należy przestrzegać dobrych praktyk laboratoryjnych i procedur kontroli jakości laboratorium w celu zapewnienia jakości zgłaszanych wyników.

ZNAKI TOWAROWE

Beckman Coulter, stylizowane logo oraz wymienione w tym dokumencie znaki produktów i usług firmy Beckman Coulter są znakami towarowymi lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Beckman Coulter, Inc. w Stanach Zjednoczonych i innych krajach.

DODATKOWE INFORMACJE

www.beckmancoulter.com

Legenda symboli

Słowniczek symboli jest dostępny pod adresem beckman.com/techdocs (numer dokumentu B60062)

Stem-Kit reagentie

REF IM3630 50 testů

Pouze pro diagnostiku *in vitro*

URČENÉ POUŽITÍ

Souprava reagentů Stem-Kit obsahuje reagenty myší monoklonální protilátky s dvoubarevným fluorescentem (FITC, PE), izoklonální kontrolu pro dvoubarevný myší fluorescent (FITC, PE), reagenty pro stanovení absolutního počtu, reagenty pro určení životnosti buněk a lyzační reagenty. Je určena pouze pro diagnostiku *in vitro* pro účely souběžné identifikace a stanovení procentního podílu CD45+ a dvojité pozitivní populace buněk CD45+ CD34+ a také absolutního počtu v biologických vzorcích s použitím průtokové cytometrie. Biologické vzorky zahrnují čerstvou normální nebo mobilizovanou periferní plnou krev a čerstvé nebo rozmražené produkty aferézy, vzorky pupečnickové krve a vzorky kostní dřeně. Měření populace buněk lze dosáhnout s použitím automatické metody nebo ruční metody pro gatování a analýzu.

V tomto příbalovém letáku k balíku sady reagentů Stem-Kit Reagents jsou uvedeny úplné pokyny pro případ použití ruční metody. Jestliže používáte automatizovanou metodu, vyhledejte úplné pokyny v příručce stemCXP System Guide (Pokyny k systému stemCXP), dodávané se softwarovou soupravou stemCXP 2.0 a stemCXP verze 2.0, WIN 7.

SHRNUTÍ

Hematopoetické progenitorní buňky (HPC)

Reagentie sady Stem-Kit jsou určeny pro identifikaci lidských hematopoetických progenitorních buněk (HPC) s použitím následujících kritérií: „Skutečné buňky CD34+ (a) exprimují antigen CD34, (b) exprimují antigen CD45 s charakteristikou intenzity obarvení blastů (tj. snadno detekovatelné, ovšem na nižších hladinách než lymfocyty a monocyty) a (c) vykazují nižší charakteristiku při malém úhlu kolmého rozptylu světla a malém až středním úhlu přímého rozptylu světla u blastů“ (1). Vyloučení mrtvých hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ z počtu buněk HPC CD34+ se životností se provádí s použitím barviva 7-AAD pro určení životnosti buněk (2).

CD34

Antigen CD34 představuje příbuzné, různě glykosylované transmembránové jednořetězcové glykoproteiny typu I (3, 4, 5). Je exprimován téměř na všech hematopoetických buňkách předchůdce včetně vícečetných kmenových buněk. Epitop CD34 byl rozdělen do tří tříd na základě citlivosti na neuraminidázu a na glykoproteázu *Pasteurella haemolytica* (6). Monoklonální protilátka CD34 (mAb) používaná v reagentiích soupravy Stem-Kit má název 581. Specificky rozpoznává epitop třídy III molekuly CD34 (7) definovanými na základě vzorů enzymatického štěpení (6, 8). Specifita rozpoznání antigenu CD34 touto monoklonální protilátkou 581 byla uznána v rámci 5. konference HLDA o lidských leukocytárních diferenciacích antigenech (5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens) konané v roce 1993 v Bostonu ve státu Massachusetts v USA (7).

CD45

Protilátka CD45 rozpoznává členy skupiny antigenů pan-leukocytů CD45 s molekulární hmotností 180, 190, 210 a 220 kD (9, 10, 11). Označuje se také názvem společný antigen leukocytu (LCA). Antigen CD45 je exprimován na každém typu hematopoetické buňky kromě zralých erytrocytů a jejich bezprostředních progenitorů (11, 12). Nebyl detekován v diferencované nonhematopoetické tkáni (12, 13, 14, 15). Látka CD45 mAb použitá v reagentiích soupravy Stem-Kit má název J33. Tato látka byla na 3. konferenci HLDA o lidských leukocytárních diferenciacích antigenech (3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens) konané v roce 1986 v Oxfordu v Anglii zařazena do skupiny CD45 (16).

7-AAD

Barvivo 7-amino-aktinomycin D (7-AAD) pro určení životnosti buněk je analogické k aktinomycinu D, který obsahuje substituovanou aminoskupinu na pozici 7 chromoforu. Barvivo 7-AAD pro určení životnosti buněk je zařazeno mezi báze DNA cytosin a guanin (15). Aktinomyciny jsou biologicky aktivní sloučeniny obsahující chromofor 2-amino-4, 6-dimethylfenoxazon-3 a dva cyklické pentapeptidy (17). Aktinomyciny tvoří stabilní komplexy s dvouřetězcovou deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), avšak nikoli s dvouřetězcovou ribonukleovou kyselinou (RNA) ani s hybridy RNA-DNA či jednořetězcovou DNA nebo RNA (15, 18).

Díky spektrálním vlastnostem barviva 7-AAD pro určení životnosti buněk je tato molekula obzvlášť vhodná pro analýzu průtokovou cytometrií (17). Maximální absorpce komplexu 7-AAD / DNA se nachází v zelené oblasti spektra, a je tudíž vhodná pro cytometr vybavený argonovým laserem (vlnová délka excitace 488 nm) (15). Sytě červené fluorescenční emise barviva 7-AAD pro určení životnosti buněk (635 až 675 nm) usnadňují použití této sondy v kombinaci s protilátkami konjugovanými fluorescein isothiokyanátem (FITC) a fykoerytrinem (PE), protože na rozdíl od propidium jodidu (PI) je překryv spektra FITC a PE u komplexu 7-AAD / DNA minimální (17).

Apoptotické a nekrotické buňky a případně poškozené buňky jsou zdrojem interference při analýze buněk se životností prováděné s použitím průtokové cytometrie. Buňky bez životnosti by měly být vyhodnoceny a diskriminovány zaměřením na pozitivní obarvení barvivem 7-AAD, kdy buňky se životností zůstávají neobarveny (negativní) (19).

Systémy průtokových cytometrů

Systémy průtokové cytometrie (FC 00) aplikují principy průtokové cytometrie při analýze biologických vzorků s cílem identifikovat různé populace buněk určené specifickými monoklonálními protilátkami a použitými fluorochromy. Současný test používá k analýze vzorků systémy průtokové cytometrie FC 500 s nainstalovaným systémovým softwarem CXP.

PRINCIP

Tento test závisí na schopnosti monoklonální protilátky vázat se na povrch buněk exprimujících diskrétní antigenní determinanty. Reagencie CD45-FITC / CD34-PE v rámci soupravy reagensů Stem-Kit představuje kombinaci dvou myších monoklonálních protilátek; každá je konjugována na specifický fluorochrom a je specifická pro jiný antigen na povrchu buňky. Obarvení specifických buněk na povrchu je dosaženo inkubací duplicitních vzorků biologického vzoru s dvoubarevnou reagensí CD45-FITC / CD34-PE.

Další test pro stejný vzorek se barví reagensí CD45-FITC / IsoClonic Control-PE s cílem ověřit nespecifickou vazbu monoklonální protilátky CD34-PE. Barvivo nukleové kyseliny 7-AAD pro určení životnosti buněk, které se váže na přístupné základní dvojice (buněčná DNA), se používá k rozlišování mezi buňkami se životností a buňkami bez životnosti. Červené krvinky v každém vzorku jsou lyzovány s použitím lyzačního roztoku NH₄Cl připraveného v poměru 1X. Poté se přidají fluorescenční částice Stem-Count nebo fluorescenční částice Flow-Count (reagencie pro stanovení absolutního počtu) a zbývající buňky jsou analyzovány s použitím průtokové cytometrie. Kontrola procesu a kontrola kvality pro rozbor jsou prováděny s použitím reagensí pro kontrolu přístrojů a kvality vzorků: fluorescenční částice Flow-Check, fluorescenční částice Flow-Set nebo vhodné kompenzační reagenty a přípravek Stem-Trol Control Cells.

PŘÍKLADY KLINICKÝCH APLIKACÍ

Z chronologického přehledu vědeckých zpráv týkajících se hematopoetických progenitorních buněk (HPC) je zřejmé, že dřívější studie byly při kvantifikaci založeny na počtech jaderných buněk. Pozdější studie využívající rozbor s použitím jednotek vytvářejících kolonie (CFU) zjišťovaly přibližné odhady populací progenitorních buněk. Po časově náročných rozbořích CFU byla objevena molekula na povrchu buňky CD34. Přítomnost látky CD34 byla zjištěna na povrchu časných hematopoetických buněk a hematopoetických buněk tvořících kolonie v kostní dřeni a periferní krvi (20). Poté byly vyvinuty monoklonální protilátky směřované proti molekule CD34 a tyto látky byly používány v průtokové cytometrii. Určování látky CD34 s použitím průtokové cytometrie je nyní běžně přijímáno jako způsob vyhodnocení hematopoetických progenitorních a kmenových buněk.

V kostní dřeni normálních jedinců má 1 až 3 % buněk exprimujících antigen CD34 schopnost rekonstituce dlouhodobé víceřadé hematopoézy (3, 20). V periferní krvi normálních jedinců exprimuje antigen CD34 méně než 0,1 % obíhajících buněk (1, 21). Použití reagensí soupravy Stem-Kit představuje jednoduchou, rychlou a citlivou metodu průtokové cytometrie pro určení počtu hematopoetických progenitorních buněk a kmenových buněk v periferní krvi, produktech leukoferézy, kostní dřeni a pupečnickové krvi.

OBSAH REAGENCIÍ

Souprava reagensí Stem-Kit obsahuje následující reagenty:

- Reagencie CD45-FITC / CD34-PE (45/34) – 1 lahvička.
- Reagencie CD45-FITC / IsoClonic Control-PE (45/CTRL) – 1 lahvička.
- Fluorescenční částice Stem-Count – 1 lahvička.
- Barvivo 7-AAD pro určení životnosti buněk – 1 lahvička.
- Lyzační roztok 10X NH₄Cl – 2 lahvičky.

1. Tyto reagenty musí být používány jako sada tak, jak jsou dodány v rámci sady.

Fluorescenční částice Flow-Count jsou ekvivalentní fluorescenčním částicím Stem-Count a lze je používat k určování absolutního počtu v případě použití specifické analyzované koncentrace.

2. Reagencie CD45-FITC / CD34-PE je dvoubarevná reagenty s možností okamžitého použití. Dodává se ve 2,2 ml fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (PBS), který obsahuje 2 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA) a 0,1 % azidu sodného jako konzervační látky.
3. Reagencie CD45-FITC / IsoClonic Control-PE je dvoubarevná reagenty s možností okamžitého použití. Dodává se v 1,2 ml fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (PBS), který obsahuje 2 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA) a 0,1 % azidu sodného jako konzervační látky. Reagencie CD45-FITC / IsoClonic Control-PE je směs nekonjugované monoklonální protilátky 581 a monoklonální protilátky 581 konjugované fykoerytrinem (identické s CD34). Tato směs má funkci odpovídající izomorfologické kontroly při ověřování nespecifické vazby CD34-PE mAb na každém vzorku.

POZNÁMKA: Reagencie CD45-FITC / CD34-PE a reagenty CD45-FITC / IsoClonic Control-PE neodděluje. Při provádění testů a kontrol je třeba dbát na to, aby obě reagenty měly na etiketě lahvičky stejné číslo šarže.

Souhrn charakteristik protilátek

Specificita	CD45	CD34
Klon	J33	581
Hybridom	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Imunogen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig řetězec	IgG1, lehké řetězce κ	IgG1, lehké řetězce κ
Druhy	Myš	Myš
Konjugace	Fluorescein-izothiokyanát (FITC)	R fykoerythrin (PE)
Molární poměr	5–8 molů FITC / mol Ig	0,5–1,5 molu fykoerythrinu / mol Ig
Excitační vlnová délka	488 nM (modrozelená)	488 nM (modrozelená)
Emise fluorescence	504 až 541 nm (převážně zelená)	568 až 590 nm (převážně oranžová)

4. Fluorescenční částice Stem-Count a fluorescenční částice Flow-Count sestávají z polystyrenových fluorescenčních mikrokoulí o průměru 10 μm (jmenovitý průměr) ve 20 ml vodní suspenze obsahující povrchově aktivní látku a 1 % formaldehydu. Každá fluorescenční částice obsahuje barvivo s rozsahem fluorescenčních emisí od 525 nm do 700 nm při excitaci na vlnové délce 488 nm. U fluorescenčních částic Stem-Count či u fluorescenčních částic Flow-Count je koncentrace v rámci rozboru (počet fluorescenčních částic / μl) odvozena z několika analýz replikátu s použitím analyzátoru velikosti částic COULTER. Specifická hodnota šarže je uvedena na etiketě lahvičky.
5. Barvivo 7-AAD pro určení životnosti buněk se dodává v 99 % fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem (PBS: 0,01 M fosfátu sodného, 0,145 M chloridu sodného, pH 7,2) s 1 % dimethylsulfoxidu (DMSO).
6. Lyzační roztok NH₄Cl je k dispozici jako 20ml roztok s koncentrací 10x. Obsahuje směs chloridu amonného (NH₄Cl), hydrogenuhličitanu draselného (KHCO₂) a disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA).

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Přípravky s monoklonálními protilátkami obsahují 0,1 % azidu sodného. V kyselém prostředí azid sodný vytváří vysoce toxickou sloučeninu kyselinu hydrazidovou. Vylévání do kanalizačních systémů by mělo být provázeno proplachováním velkým množstvím tekoucí vody, aby se zabránilo nebezpečnému hromadění v kovových potrubích a případným výbuchům.
2. S odebranými vzorky, zpracovanými vzorky a s veškerým materiálem, který s nimi přišel do styku, je třeba zacházet jako s materiálem potenciálně infekčním, který je třeba likvidovat dle platných bezpečnostních nařízení.
3. Nikdy nepipetujte ústy, vždy se vyhýbejte vzorků či reagentů kontaktu s pokožkou a sliznicemi.
4. Reagencie nepoužívejte po datu použitelnosti uvedeném na etiketě lahvičky.
5. Fluorescenční částice Stem-Count a fluorescenční částice Flow-Count obsahují 1 % formaldehydu. Zamezte styku s očima a pokožkou, protože formaldehyd může způsobit nevratné poškození těchto tkání. Nevdechujte páry. Používejte vhodné ochranné prostředky, jako jsou ochranné rukavice a ochranné prostředky pro oči.
6. Reagencie sady Stem-Kit během skladování a používání nevystavujte působení silného světla nebo tepla.
7. Zabraňte odpařování a úniku fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count, jinak mohou být výsledky chybné. Lahvičky po použití těsně uzavřete víčkem a skladujte je ve svislé poloze.
8. Před použitím zajistěte kompletní resuspendování fluorescenčních částic. Zabraňte nadměrnému míchání, aby nedocházelo ke vzniku vzduchových bublin. Při pipetování nesmí do pipety vniknout vzduchové bubliny, jinak mohou být výsledky chybné.
9. Vzorky a fluorescenční částice Stem-Count nebo fluorescenční částice Flow-Count dávkujte s použitím kalibrované pipety (upřednostňují se pipety s pozitivním nesprávným umístěním nebo opakovací pipety), jinak mohou být výsledky chybné.
10. Aby bylo zajištěno přesné a precizní pipetování vzorků a fluorescenčních částic Stem-Count či fluorescenčních částic Flow-Count, používejte pipetovací techniky doporučené výrobcem pipety, jinak mohou být výsledky chybné.
11. Obarvené a lyzované vzorky je třeba skladovat na ledu a analyzovat v průtokovém cytometru podle informací v části „Stabilita zpracovaného vzorku“, jinak mohou být výsledky chybné.
12. Zajistěte započítání alespoň 1 000 fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count, jinak nedojde k automatickému převodu výsledků na absolutní počet.
13. Každá šarže fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count obsahuje specifickou koncentraci fluorescenčních částic. Při stanovení výsledků absolutního počtu se ujistěte, že byla použita správná hodnota stanovené koncentrace.
14. Nesmí se používat metody přípravy zahrnující promývací kroky, protože při nich dochází ke ztrátám buněk, jejichž rozsah není znám.

15. V případě použití jiných časů inkubace nebo míchání či jiné teploty, než je stanoveno, mohou být výsledky chybné.
16. Barvivo 7-AAD pro určení životnosti buněk obsahuje 0,005 % 7-AAD. Čistá látka 7-AAD je potenciální karcinogen. Ačkoli je tato sloučenina vysoce zředěná, doporučujeme zamezit styku s kůží a očima a nosit vhodný ochranný oděv, rukavice a vhodné ochranné brýle / obličejový štít.
17. Barvivo 7-AAD pro určení životnosti buněk obsahuje 1 % dimethylsulfoxidu (DMSO). Čistý dimethylsulfoxid je dráždivá látka. Ačkoli je tato sloučenina zředěná, doporučujeme zamezit styku s kůží a očima a nosit vhodný ochranný oděv, rukavice a vhodné ochranné brýle / obličejový štít.
18. Látka 7-AAD je jakožto chromofor citlivá na světlo. Barvivo 7-AAD pro určení životnosti buněk skladujte v kartonovém obalu soupravy, aby látka během skladování nebyla trvale vystavena působení světla.
19. Během inkubace minimalizujte vystavení směsných vzorků působení světla.
20. Při manipulaci s reagenty dodržujte obecné zásady správné laboratorní praxe.

KLASIFIKACE NEBEZPEČÍ PODLE GHS

Stem-Count Fluorospheres

NEBEZPEČÍ



H316

Způsobuje mírné podráždění kůže.

H317

Může vyvolat alergickou kožní reakci.

H350

Může vyvolat rakovinu.

P201

Před použitím si obzarejte speciální instrukce.

P280

Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.

P308+P313

PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

P333+P313

Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

P362+P364

Kontaminované části oděvu svlékněte a před použitím vyperte.

Formaldehyd 0,5 - 1,0 %

reakční směs:

5-chlor-2-methyl-4-isothiazol-3(2H)-on [číslo ES 247-500-7] a

2-methyl-4-isothiazol-3(2H)-on [číslo ES 220-239-6] (3:1) < 0,05 %

7-AAD Viability Dye

VAROVÁNÍ

H316

Způsobuje mírné podráždění kůže.

P332+P313

Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Dimethylsulfoxid 0,5 - 2 %



Bezpečnostní list je k dispozici na adrese beckman.com/techdocs

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Neotevřená reagentie je stabilní až do data expirace uvedeného na lahvičce, je-li skladována při teplotě 2–8 °C za nepřítomnosti světla. Po datu expirace nepoužívejte. Nezmrazujte. Reagentie soupravy Stem-Kit jsou stabilní po dobu 30 dnů od otevření lahvičky s fluorescenčními částicemi Stem-Count nebo s fluorescenčními částicemi Flow-Count. Otevřené lahvičky je třeba ihned po použití znovu uzavřít víčkem a musí být skladovány při teplotě 2–8 °C za nepřítomnosti světla. NEVYTVÁŘEJTE alikvoty fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count z původní lahvičky.

DŮLEŽITÉ:

V případě úniku fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count hrozí riziko chybných výsledků. Po otevření musí být fluorescenční částice Stem-Count nebo fluorescenční částice Flow-Count skladovány ve svislé poloze, aby se zabránilo úniku. Reagentie by se neměly používat, jsou-li na nich zjištěny známky úniku.

Známky znehodnocení

V následujících situacích se mohou vyskytnout známky znehodnocení:

Reagencie v soupravě Stem-Kit s výjimkou fluorescenčních částic Stem-Count

- Změna normálního vzhledu podle popisu níže

Reagencie	Normální vzhled
CD45-FITC / CD34-PE	Čirá, mírně růžová kapalina
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Čirá až mírně růžová kapalina
7-AAD Viability Dye	Čirá, mírně růžová až načervenalá kapalina
Lyzační roztok NH_4Cl	Čirá, bezbarvá kapalina

Stem-Count Fluorospheres

- Vzhled sekundárních fluorescenčních populací obsahujících více než 20 % celkové populace fluorescenčních částic (během získávání).
- Významná odchylka hodnot získaných pro počty nebo vzorky.

DŮLEŽITÉ: Reagencie nepoužívejte, pokud na nich byly zjištěny známky znehodnocení, protože by mohly být získány nesprávné výsledky. V případě zjištění známek znehodnocení se obraťte na místního zástupce společnosti Beckman Coulter.

Příprava reagentie

- Dvoubarevné reagentie CD45-FITC / CD34-PE a CD45-FITC / IsoClonic Control-PE se používají přímo z lahviček bez jakéhokoli ředění.
- Fluorescenční částice Stem-Count nebo fluorescenční částice Flow-Count se používají přímo z lahvičky bez jakéhokoli ředění. Po prvním otevření je nutné odstranit z vrchní části všechny hliníkové části teplem zataveného pertlu. Je potřebné provést řádné promíchání. Při první manipulaci s lahvičkou s fluorescenčními částicemi Stem-Count nebo s fluorescenčními částicemi Flow-Count na začátku dne míchejte po dobu 3–5 sekund.

Před pipetováním z lahvičky obsah mírně zviňte překlopením lahvičky 3–5x.

Po počátečním promíchání na začátku dne vraťte fluorescenční částice do prostředí s teplotou 2–8 °C, dokud nebudou používány.

Zabraňte odpařování a úniku těsným uzavřením víčka po použití.

- Barvivo 7-AAD pro určení životnosti buněk se používá přímo z lahvičky bez jakéhokoli ředění.
- Lyzační roztok 1X NH_4Cl je třeba připravovat denně: přidejte devět dílů deionizované vody k jednomu dílu koncentrovaného lyzačního roztoku 10X NH_4Cl . Neuchovávejte v chladničce. Nepoužitý lyzační roztok 1X NH_4Cl na konci dne zlikvidujte.

Před použitím nechte všechny reagentie nabýt pokojové teploty (18–25 °C).

MANIPULACE SE VZORKEM

Požadavky na vzorky

Shrnutí manipulace se vzorky:

Typ vzoru	Metoda brány	Skladovací teplota	Stáří vzorku
Aferéza	Algoritmus	2–8 °C	24 h
	Návod	2–8 °C	24 h
Kostní dřev	Algoritmus	2–8 °C	24 h
	Návod	2–8 °C	24 h
Pupečníková krev	Algoritmus	18–25 °C	24 h
	Návod	18–25 °C	24 h
Normální plná krev	Algoritmus	18–25 °C	20 hodin
	Návod	18–25 °C	20 hodin
Mobilizovaná plná krev	Algoritmus	18–25 °C	20 hodin
	Návod	18–25 °C	20 hodin

- Biologické vzorky zahrnují čerstvou normální nebo mobilizovanou periferní plnou krev a čerstvé nebo rozmrazené produkty aferézy, vzorky pupečníkové krve a vzorky kostní dřev.
- Manipulované nebo purifikované hematopoetické progenitorní buňky (HPC) lze analyzovat pouze metodou ručního gatování.

3. Asepticky odeberte produkty aferézy, vzorky periferní krve, vzorky pupečnickové krve či vzorky kostní dřeně do sterilní evakuované zkumavky pro odebrání krve s ACD vzorec A nebo antikoagulační činidlo K3 EDTA.
4. Vzorky plné krve a mobilizované vzorky plné krve odebrané v antikoagulačních zkumavkách mohou být před značením skladovány po dobu až 20 hodin při pokojové teplotě (18–25 °C).
5. Vzorky pupečnickové krve odebrané v antikoagulačních zkumavkách mohou být před značením skladovány po dobu až 24 hodin při pokojové teplotě (18–25 °C).
6. Produkty odebrané aferézou a vzorky kostní dřeně lze před značením skladovat po dobu až 24 hodin při teplotě 2–8 °C.
7. Před přípravou vzorku ověřte, že koncentrace bílých krvinek není větší než 30×10^9 bílých krvinek / l. V případě potřeby zředte vzorek přípravkem HBSS nebo ekvivalentním, aby byla dosažena průměrná hodnota 15×10^9 bílých krvinek / l. Faktor ředění zaznamenejte kvůli výpočtu konečného absolutního počtu hematopoetických progenitorních buněk (HPC).
8. Nízké koncentrace proteinů mohou vést ke shlukování fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count a absolutní počty buněk pak mohou chybně dosahovat příliš vysokých hodnot. Ředění vzorků s nízkou koncentrací proteinů je třeba provádět s použitím pufru obohaceného proteiny.
9. Všechny vzorky by měly být zpracovány s použitím reagensí soupravy Stem-Kit včetně barviva 7-AAD pro určení životnosti buněk.

Zpracování vzorku

Testy provádějte duplicitně podle pokynů „The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry“ (Pokyny ISHAGE pro určování buněk CD34+ průtokovou cytometrií) (1).

POZNÁMKA: Při zpracování přípravku Stem-Trol Control Cells naleznete úplné pokyny v případě použití ruční metody na příbalovém letáku k balíku přípravku Stem-Trol Control Cells. Úplné pokyny v případě použití automatické metody analýzy naleznete v příručce stemONE System Guide (Příručka k systému stemONE) dodávané spolu se softwarem systému stemONE nebo v příručce stemCXP System Guide (Příručka k systému stemCXP) dodávané spolu se softwarem systému stemCXP.

1. Pro každý vzorek označte tři zkumavky následujícím způsobem:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipetou přeneste 20 µl reagensie CD45-FITC / CD34-PE do zkumavek: 45/34/7-AAD #1 a 45/34/7-AAD #2.
3. Pipetou přeneste 20 µl reagensie CD45-FITC / IsoClonic Control-PE do zkumavky: 45/CTRL/7-AAD.
4. Do každé zkumavky přeneste pipetou 20 µl barviva pro určení životnosti buněk 7-AAD.

DŮLEŽITÉ: Hrozí riziko neúplné lýzy, pokud vzorek krve zůstane ve zkumavce na horní nebo boční straně. Při pipetování postupujte opatrně, aby nedošlo ke kontaktu krve s horní nebo boční stranou zkumavky. V případě potřeby zkumavku vyčistěte bavlněným tampónem a odstraňte z horní a boční strany zkumavky veškeré stopy vzorku krve.

5. Pomocí pipety s pozitivním nesprávným umístěním nebo opakovací pipety přeneste do zkumavky 100 µl vzorku pacienta.
6. Zkumavku ihned promíchejte na vortexu po dobu 5 vteřin.
7. Inkubujte všechny zkumavky 20 minut při pokojové teplotě (18–25 °C) bez přístupu světla.
8. Po inkubaci přidejte do každé zkumavky 2 ml připraveného lyzačního roztoku 1X NH4Cl a ihned jej míchejte po dobu 5 sekund.

POZNÁMKA: Podrobnosti ohledně přípravy lyzačního roztoku naleznete v části 7.2 výše pod nadpisem PŘÍPRAVA REAGENCIÍ.

DŮLEŽITÉ: V případě pipetování vzduchových bublin hrozí riziko chybných výsledků. Při nadměrném míchání fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count může docházet ke vzniku vzduchových bublin. Neprovádějte nadměrné míchání fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count a nepipetujte do zkumavek se vzorky vzduchové bubliny.

9. Inkubujte 10 minut při pokojové teplotě bez přístupu světla.
10. Fluorescenční částice Stem-Count nebo fluorescenční částice Flow-Count před použitím lehce promíchejte překlopením lahvičky 3krát až 5krát.
11. Před akvizicí a okamžitě po provedení 9. kroku přeneste pipetou s pozitivním výtlačkem nebo opakovací pipetou 100 µl fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count do každé ze tří zkumavek.
12. Každou zkumavku ihned míchejte po dobu 5 sekund.

POZNÁMKA: Podrobnosti ohledně přípravy lyzačního roztoku naleznete v části 7.2 výše pod nadpisem PŘÍPRAVA REAGENCIÍ.

Souhrn obarvování vzorků

Reagencie/vzorky	45/34/7-AAD #1	Testovací zkumavka s označením 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µl	20 µl	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µl
7-AAD Viability Dye	20 µl	20 µl	20 µl
vzorek	100 µl	100 µl	100 µl
Promíchejte – provádějte inkubaci při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Chraňte před světlem..			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 ml	2 ml	2 ml
Promíchejte – provádějte inkubaci při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Chraňte před světlem..			
Stem-Count Fluorospheres	100 µl	100 µl	100 µl
Vortexová míchačka			
U produktů odebraných aferézou, vzorků pupečnickové krve a vzorků kostní dřeně nečekejte před akvizicí na ledu déle než 60 minut.			
U vzorků plné krve a mobilizovaných vzorků plné krve nečekejte před akvizicí na ledu déle než 45 minut.			
Rozmrazený vzorek ihned analyzujte.			
Chraňte před světlem			

Stabilita zpracovaného vzorku:

- U produktů odebraných aferézou, vzorků pupečnickové krve a vzorků kostní dřeně, po přidání fluorescenčních částic Stem-Count nebo Flow-Count nečekejte před akvizicí na ledu více než 60 minut.
- U vzorků plné krve a mobilizovaných vzorků plné krve po přidání fluorescenčních částic Stem-Count nebo Flow-Count nečekejte před akvizicí na ledu více než 45 minut.
- Pořízení zmrazeného vzorku by mělo být provedeno bezprostředně po přidání fluorescenčních částic Stem-Count nebo Flow-Count.
- Zpracované vzorky musí být uskladněny na ledu chráněném před světlem a během akvizice co nejvíce omezit expozici na pokojovou teplotu.

OBSAH

Konzervační látka azid sodný může v kovovém odpadním potrubí vytvářet výbušné sloučeniny. Viz bulletin NIOSH: Explosive Azide Hazard (Nebezpečí výbušných azidů) (16.8.76).

Po vypuštění neředěné reagentie propláchněte odpadní potrubí vodou, aby se v něm nehromadily azidové sloučeniny. Likvidace azidu sodného musí být prováděna podle příslušných místních předpisů.

MATERIÁLY POTŘEBNÉ, ALE NEDODANÉ SE SOUPRAVOU:

1. Deionizovaná voda.
2. Solný roztok HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) nebo ekvivalentní látka
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Alternativa k přípravku Stem-Count Fluorospheres: přípravek Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
9. Ledová lázeň
10. Plastové zkumavky (12 x 75 mm)
11. Kalibrovaná opakovací pipeta (20 µl, 100 µl, 2 ml) a špičky nebo kalibrované pipety s pozitivním nesprávným umístěním (20 µl, 100 µl, 2 ml) a špičky
12. Kalibrovaná pipeta standardního typu (20 *L, 100 *L, 2 ml) a výměnné špičky.
13. Přístroj typu vortex pro míchání vzorků.

14. Stopky.
15. Průtokový cytometr.
16. Softwarová souprava stemCXP 2.0, stemCXP verze 2.0, WIN 7, POUZE pro automatickou analýzu vzorků na systému průtokového cytometru FC 500, který je vybavený softwarem CXP (verze 2.0).

VÝSLEDKY

Nastavení protokolu analýzy

Průtokový cytometr musí být vybaven pro detekování přímého rozptylu, kolmého rozptylu a čtyř fluorescenčních kanálů. Pro kanál FL3 (v případě monitorování fluorescenčních částic Stem-Count nebo Flow-Count) použijte filtr průchodu pro pásmo 620 nm. Pro kanál FL4 (v případě monitorování barviva pro určení životnosti buněk 7-AAD) použijte filtr průchodu pro délku 675 nm.

Ověřte, že je průtokový cytometr řádně seřízen a standardizován z hlediska intenzity fluorescence.

9.2.3 Ověřte, že je správně nastavena kompenzace fluorescencí.

POZNÁMKA: Při analýze vzorků jsou pozice všech oblastí přibližné až do dokončení získávání pro zkumavku 45/34/7-AAD #1. Oblasti jsou optimalizovány podle následujícího protokolu a poté NEJSOU upraveny pro druhou a třetí zkumavku v rámci panelu.

Při analýze vzorků je třeba dodržovat posloupnost 8 histogramů a schéma gatování (viz níže). Táž posloupnost 8 histogramů a schéma gatování se musí dodržovat v případě použití kontrolních buněk CD34+. Oblasti A, B, C a D (definice oblastí jsou uvedeny pod nadpisem Vytváření oblastí) je třeba upravit tak, aby obsahovaly shluk s charakteristikou kontrolních buněk CD34+.

Vytvoření histogramů

Vytvořte histogramy následujícím způsobem:

1. Pomocí parametrů FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter (kolmý rozptyl) vytvořte histogram 1.
2. Pomocí parametrů FL2 CD34-PE vs. Side Scatter (kolmý rozptyl) vytvořte histogram 2.
3. Pomocí parametrů FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter (kolmý rozptyl) vytvořte histogram 3.
4. Pomocí parametrů Forward Scatter (přímý rozptyl) vs. Side Scatter (kolmý rozptyl) vytvořte histogram 4.
5. Pomocí parametrů FL1 CD45-FITC vs. FL2 CD34-PE vytvořte histogram 5.
6. Pomocí parametrů Forward Scatter (přímý rozptyl) vs. Side Scatter (kolmý rozptyl) vytvořte histogram 6.
7. Pomocí parametrů Time (čas) vs. FL3 pro fluorescenční částice Stem-Count nebo Flow-Count vytvořte histogram 7.
8. Pomocí parametrů FL4 barviva 7-AAD pro určení životnosti buněk vs. Side Scatter (kolmý rozptyl) vytvořte histogram 8.

Histogramy 1 až 4 jsou určeny pro charakterizaci hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+; provedení tohoto procesu lze odložit až po provedení kroku analýzy. První čtyři histogramy jsou nastaveny s použitím pokynů ISHAGE pro určování buněk CD34+ průtokovou cytometrií (1, 2). Histogramy 5 až 7 jsou určeny pro monitorování důležitých parametrů během kroku získání. Patří mezi ně diskriminátor přímého rozptylu, počet událostí CD45+, které mají být shromážděny, a správná akumulace singletů fluorescenčních částic.

Histogram 8 je určen pro diskriminaci a analýzu událostí s určitou životností od událostí bez životnosti.

Vytvoření oblastí (regionů)

Následujícím způsobem vytvořte regiony.

1. Histogram 1 – vytvořte přímočarou oblast A v histogramu 1 tak, aby obsahovala všechny leukocyty CD45+ a eliminovaly se krevní destičky, nečistoty buněk červených krvinek a agregace.
2. Histogram 1 – vytvořte amorfnní oblast E v histogramu 1 tak, aby obsahovala lymfocyty (jasné zobrazení CD45, nízký kolmý rozptyl).
3. Histogram 2 – vytvořte přímočarou oblast B v histogramu 2, která zahrnuje všechny události CD34+. Pro histogram 2 nastavte hodnotu zastavení počtu 75 000 událostí (události CD45+).
4. Histogram 3 – vytvořte amorfnní oblast C v histogramu 3, která zahrnuje všechny shromážděné události CD45dim.
5. Histogram 4 – vytvořte amorfnní oblast D v histogramu 4 pro zahrnutí všech shromážděných událostí s okamžitým kolmým rozptylem a okamžitým až vysokým přímým rozptylem.
6. Histogram 5 – vytvořte čtvercovou oblast I v histogramu 5, aby se ověřila spodní hranice exprese CD45 u událostí CD34+.

7. Histogram 5 – vytvořte amorfni oblast H v histogramu 5, která bude obklopovat všechny fluorescenční částice Stem-Count nebo Flow-Count včetně dublet. Oblast H by měla být umístěna v pravém horním rohu histogramu 5.

POZNÁMKA: Ověřte, že je oblast H vykreslena jako oblast AMORPHOUS (Amorfni).

8. Histogram 5 – vytvořte přímočarou oblast K (s názvem „listgate –“) v histogramu 5. Nastavte hranice oblasti K jako první dekádu logaritmu dvouparametrového histogramu. Tato oblast K umožňuje eliminovat dvojité negativní události během získávání s cílem analyzovat 75 000 relevantních událostí CD45+.
9. Histogram 6 – zkopírujte oblast D z histogramu 4 jako oblast F v histogramu 6.
10. Histogram 7 – vytvořte přímočarou oblast G v histogramu 7, která bude obklopovat pouze singlety fluorescenčních částic Stem-Count nebo fluorescenčních částic Flow-Count. Oblast G lze označit „CAL“, aby bylo možné provádět automatický výpočet absolutního počtu hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ (podrobnější informace naleznete v příručce k přístroji).
11. Histogram 8 – vytvořte přímočarou oblast J v histogramu 8, která bude obsahovat leukocyty se životností (negativní události po použití barviva 7-AAD pro určení životnosti buněk).

Vytvoření "gatů"

Následujícím způsobem vytvořte gaty:

1. Histogram 1 – přiřadte položku „J“ k histogramu 1, aby se zobrazovaly všechny události se životností. Není-li látka 7-AAD použita, přiřadte oblast „H“ k histogramu 1, aby se zobrazovaly všechny události kromě fluorescenčních částic Stem-Count či fluorescenčních částic Flow-Count včetně dublet.
2. Histogram 2 – přiřadte položku „AJ“ (položku „A“, není-li použita látka 7-AAD) k histogramu 2, aby se zobrazovaly události CD34+ se životností (celkový počet, není-li použita látka 7-AAD).
3. Histogram 3 – přiřadte položku „A“, „B“ a „J“ (položku „A“ a „B“, není-li použita látka 7-AAD) k histogramu 3, aby se všechny zobrazovaly události se životností CD45+/CD34+ (celkový počet, není-li použita látka 7-AAD).
4. Histogram 4 – přiřadte položku „A“, „B“, „C“ a „J“ (položku „A“, „B“ a „C“, není-li použita látka 7-AAD) k histogramu 4, aby se zobrazovaly události CD45+/CD34+ se životností (všechny, není-li použita látka 7-AAD) ve shlucích s nízkým kolmým rozptylem při vyloučení krevních destiček a šumu. Události z oblasti ABCDJ jsou skutečné hematopoetické progenitorní buňky (HPC) CD34+ se životností.
5. Histogram 5 – bez gatu, pro zobrazení všech naměřených částic.
6. Histogram 6 – přiřadte položku „EJ“ (položku „E“, není-li použita látka 7-AAD) k histogramu 6, aby se zobrazovaly lymfocyty se životností (celkový počet, není-li použita látka 7-AAD), jako vizuální kontrola diskriminátoru.
7. Histogram 7 – přiřadte položku „H“ k histogramu 7, aby se zobrazovaly všechny fluorescenční částice Stem-Count nebo fluorescenční částice Flow-Count včetně dublet.
8. Histogram 8 – přiřadte položku „A“ k histogramu 8 tak, aby byly zobrazeny události CD45+.

Nastavení průtokové cytometrie

1. Ověřte, že je průtokový cytometr řádně seřízen a optimalizován pro měření rozptylu světla a intenzity fluorescence detektorů FL1, FL2, FL3 a FL4 podle doporučení výrobce a laboratorních směrnic. Ověřte, že je kompenzace barev nastavena pro standardní provoz. Další pokyny naleznete v příručce k přístroji.
2. Zkumavky míchejte po dobu 5 sekund.
3. Proveďte získání dat na průtokovém cytometru. Analyzováno musí být nejméně 75 000 událostí CD45+.
4. Pro analýzu vzorků: Upravte diskriminátor a oblasti provedením analýzy zkumavky se vzorkem 45/34/7-AAD #1. Uložte protokol a analyzujte zkumavky 45/34/7-AAD #2 a 45/CTRL/7-AAD bez dalších úprav.

Příklad analýzy

Histogramy uvedené v příloze jsou zobrazeny vzestupně podle počtu pro zobrazení v protokolu.

Výpočet počtu hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ pro vzorek

Počet hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ je stanoven jako průměr statistických výsledků v oblasti D pro oba replikované vzorky (tj. 45/34/7-AAD #1 a 45/34/7-AAD #2).

Výsledky hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ jsou považovány za platné, pokud výsledky získané reagenty CD45-FITC / IsoClonic Control-PE tvoří méně než 10 % výsledků hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+.

1. Určete průměr výsledků získaných ze zkumavek 45/34/7-AAD #1 a 45/34/7-AAD #2 pro každý vzorek (tj. průměr výsledků ve výtisku statistiky pro oblast D). Počet hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ může ležet v intervalu odchylky 10 % od střední hodnoty pro duplicitní vzorky. Hodnota zjištěná použitím kontrolní zkumavky 45/CTRL/7-AAD musí představovat méně než 10 % průměrné hodnoty získané z testovacích zkumavek, aby bylo možné výsledky ověřit.

POZNÁMKY: Pokud střední hodnota pro absolutní počet zjištěný pro duplicitní hematopoetické progenitorní buňky (HPC) CD34+ leží mimo přijatelný rozsah (tj. přesahuje 10 %), určete, zda bylo pipetování provedeno správně, zejména pro fluorescenční částice Stem-Count nebo fluorescenční částice Flow-Count. Vizuálně zkontrolujte zprávy průtokového cytometru a kvalitu procesů obarvování a lýzy ve zkumavkách. Ověřte způsob nastavení hranic oblastí.

Pokud hodnota zjištěná s použitím látky 45/CTRL/7-AAD leží mimo rozsah přijatelných hodnot (tj. překračuje 10 % střední hodnoty absolutního počtu zjištěné pro duplikát), určete, zda bylo pipetování provedeno správně, zejména pro fluorescenční částice Stem-Count nebo fluorescenční částice Flow-Count. Vizuálně zkontrolujte zprávy průtokového cytometru a kvalitu procesů obarvování a lýzy ve zkumavkách. Ověřte způsob nastavení hranic oblastí.

V případě potřeby opakujte krok získání s přidáním zkumavky BLANK po první duplicitní zkumavce 45/34/7-AAD #1 a #2 a před zkumavkou 45/CTRL/7-AAD. V případě potřeby opakujte celou přípravu s novými testovacími zkumavkami s přidáním zkumavky BLANK. Získejte a analyzujte novou i předchozí sérii zkumavek. Oba výsledky porovnejte. Pokud se neshodují, obraťte se na místního zástupce společnosti Beckman Coulter.

2. Pokud byl vzorek naředěn, je NUTNÉ vynásobit získaný výsledek uvedený výše příslušným faktorem ředění (Dil). Konečný získaný výsledek představuje absolutní počet hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ (buňky/ μ l).

Absolutní počet hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ (buňky/ μ l) = výsledky ve výtisku absolutního počtu hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ (buňky/ μ l) x faktor ředění

3. V případě série po aferéze lze celkový počet hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ na sérii vypočítat pomocí následujícího vzorce:

Celkový počet hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ na sérii = absolutní počet HPC CD34+ (buňky/ μ l) x 10^6 x objem série (l)
--

Kde:

4. Při výpočtu hodnoty procentního podílu hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ mezi leukocyty CD45+ použijte následující vzorec:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Absolutní počet hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ (buňky/ μ l)} \quad \text{(tj. výsledky ve výtisku oblasti D)}}{\text{Absolutní počet leukocytů CD45+ (buňky/ μ l)} \quad \text{(tj. výsledky ve výtisku oblasti A)}} \times 100$$

KONTROLA KVALITY

Ověřte, že je průtokový cytometr řádně seřízen podle doporučení výrobce uvedených v příručkách k přístroji. Cílové hodnoty intenzity byly stanoveny tak, aby byly rozptýl světla a nastavení fluorescence v přístroji optimální pro analýzu vzorků obarvených reagensy monoklonální protilátky CD45-FITC / CD34-PE a reagensy CD45-FITC IsoClonic Control-PE.

Fluorochromy fluorescein isothiokyanát (FITC) a fykoerytrin (PE) a barvivo 7-amino aktinomycin D (7-AAD) emitují při různých vlnových délkách, ale přesto mají určitý spektrální překryv, který musí být korigován elektronickou kompenzací. Optimální hladiny kompenzace lze určit analýzou s použitím dvouparmetrového histogramu u vzorku plné krve obohacené přípravkem s kontrolními buňkami Stem-Trol Control Cells po obarvení barvivem 7-AAD pro určení životnosti buněk nebo odpovídajícími kompenzačními reagensy v případě použití softwaru CXP. V rámci této analýzy se provádějí úpravy, které zajišťují, aby nedocházelo k žádnému obarvování v kvadrantu dvou barev se žádným jednotlivým fluorochromem.

Barvivo 7-AAD (7-amino aktinomycin D) pro určení životnosti buněk slouží k identifikaci buněk bez životnosti provedením analýzy průtokovou cytometrií, aby bylo možné určit počet zkoumaných buněk se životností. Barvivo se aplikuje na mrtvé buňky (jasně viditelné události), jež jsou následně vyloučeny z buněk se životností (negativní události) provedením gatování (viz histogram 8).

Před analýzou vzorků by měla být analyzovaná kontrola (Stem-Trol Control Cells) obarvena, aby byla ověřena reaktivita protilátek.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Poskytnuté funkční charakteristiky jsou založeny na reagentech soupravy Stem-Kit použitých s průtokovým cytometrem COULTER EPICS XL/XL-MCL vybaveným softwarem System II. Příklady použití na cytometru FC 500 se softwarem CXP naleznete v příručce stemCXP System Guide (Příručka k systému stemCXP).

Očekávané hodnoty pro referenční rozsahy

Z populace mužů (n = 58) a žen (n = 59) byly odebrány vzorky normální plné krve (n = 117) s cílem získat normální referenční rozsah. Tato studie byla provedena na externím hodnoticím pracovišti. Replikované testy pro každý vzorek byly připraveny podle pokynů na příbalovém letáku v balíku soupravy reagentů Stem-Kit. Bylo provedeno ruční gatování a analýza s cílem zjistit hodnoty CD45+, CD34+ a CD34 %.

Statistická analýza indikuje negaussovské rozdělení shromážděných dat. Na základě těchto zjištění byl pro analýzu dat použit neparametrický (robustní) přístup. Byly zjištěny hodnoty CD45+, CD34+ a CD34 %. Hodnoty jsou vyjádřeny jako absolutní počty (buněk/μl) pro CD45+ a CD34+ a jako procentní podíl z celkového počtu leukocytů (CD34 %), jak je uvedeno v následující tabulce.

Normální plná krev: Referenční rozsahy

Ruční metoda (robustní analýza)	n	CD45+ (buněk/μl)				CD34+ (buněk/μl)				CD34+ (%)			
		Min.	Max.	Střed. hodn. (směrodatná odchylka)	SD	Min.	Max.	Střed. hodn. (směrodatná odchylka)	SD	Min.	Max.	Střed. hodn.	SD (směrodatná odchylka)
Ruční	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Tyto hodnoty by měly být pouze reprezentativní. Každá laboratoř si musí stanovit vlastní očekávané hodnoty na základě místní populace normálních dárců.

Linearita

Replikační měření byla prováděna s každým ze série 10 ředění pro 2 typy vzorků: periferní plná krev obohacená CD34+ a čerstvá mobilizovaná periferní plná krev. Pro koncentrace hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ byl dosažen dynamický rozsah 0 až 2 000 buněk/μl a rozsah citlivosti při malém množství 0 až 150 buněk/μl. Vzorky byly připraveny podle pokynů na příbalovém letáku k balíku reagentů sady Stem-Kit a byla provedena analýza na průtokovém cytometru COULTER EPICS XL/XL-MCL. Hodnoty jsou vyjádřeny jako absolutní počty (buněk/μl). Výsledky byly analyzovány postupy lineární regresní analýzy pro očekávané versus zjištěné absolutní počty pro střední hodnotu replikátů po odečtení endogenních buněk CD34+. Viz následující tabulky.

Směrnice linií regrese poskytnuté spolu s diagramy pro celkové absolutní počty hematopoetických progenitorních buněk (HPC) CD34+ vykazují matematickou míru linearity. Tato skutečnost je podpořena minimální potenciální odchylkou rozboru prokázanou Y-úseky pro analýzy. Očekávané absolutní počty prokazují vysokou míru korelace se zjištěnými absolutními počty.

Výsledky pro plnou krev obohacenou CD34+

Graf je uveden v příloze.

Výsledky periferní (mobilizované) krve

Graf je uveden v příloze.

Přesnost metody (tabulky) (očekávané/zjištěné výsledky)

Přesnost metody je definována jako míra shody mezi očekávanými a opakovanými výsledky pro ruční i automatické metody gatování a analýzy. Čerstvá normální periferní plná krev byla obohacena purifikovanými buňkami CD34+ až na úroveň 1 875 buněk/μl. Počty buněk byly potvrzeny Malassezovým posuvným zařízením na počítání buněk. Očekávané výsledky jsou porovnány s opakovanými výsledky z hlediska střední hodnoty duplicitních měření s použitím automatického a ruční gatování a analýzy pro každou hladinu ředění. Testování směrnice a souřadnice na určeném úseku neprokázalo žádné statistické rozdíly mezi automatickým gatováním a analýzou a očekávanými výsledky ani mezi ručním gatováním a analýzou a očekávanými výsledky.

Přesnost metody – CD34+ (%)

Graf je uveden v příloze.

Přesnost metody – CD34+, absolutní počet (buněk/μl)

Graf je uveden v příloze.

Přesnost metody – Celkový počet leukocytů – CD45+ (buněk/μl)

Graf je uveden v příloze.

Přesnost metody (automatizované vs. manuální výsledky)

Studie míry přesnosti pro automatickou a ruční metodu s použitím systému stemONE byla prováděna na čtyřech externích hodnoticích pracovištích s použitím čerstvé periferní plné krve a čerstvých nebo rozmrazených produktů aferézy, vzorků pupečnickové krve a vzorků plné krve. Intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočteny s mezními hodnotami 95 %.

Podle pokynů na příbalovém letáku k balíku sady reagentů Stem-Kit byly připraveny čerstvé vzorky periferní plné krve (n = 59 ze tří míst), čerstvé produkty aferézy (n = 51 ze tří míst), čerstvé vzorky pupečnickové krve (n = 29 ze dvou míst), čerstvé vzorky kostní dřeně (n = 33 ze dvou míst), rozmrazené produkty aferézy (n = 23 z jednoho místa), rozmrazené vzorky pupečnickové krve (n = 31 ze dvou míst) a rozmrazené vzorky kostní dřeně (n = 20 z jednoho místa) a byla provedena jejich analýza na průtokových cytometrech COULTER EPICS XL/XL-MCL. Bylo provedeno automatické a ruční gatování a analýza s cílem zjistit hodnoty CD45+, CD34+ a CD34 %.

Přesnost metod (obrázky)

Čerstvé vzorky periferní plné krve (n = 59)

Graf je uveden v příloze.

Čerstvé vzorky po aferéze (n = 51)

Graf je uveden v příloze.

Čerstvé vzorky pupečnickové krve (n = 29)

Graf je uveden v příloze.

Čerstvé vzorky kostní dřeně (n = 33)

Graf je uveden v příloze.

Rozmrazené vzorky po aferéze (n = 23)

Graf je uveden v příloze.

Rozmrazené vzorky pupečnickové krve (n = 31)

Graf je uveden v příloze.

Rozmrazené vzorky kostní dřeně (n = 20)

Graf je uveden v příloze.

Preciznost

Mezilaboratorní přesnost

Studie byly prováděny v rámci jednoho klinického zařízení třemi operátory, přičemž každý používal jiný průtokový cytometr. Byly identifikovány tři vzorky reprezentující dynamický rozsah CD34+ (0–2 000 buněk/μl):

Nízký rozsah:	čerstvá mobilizovaná periferní krev
Střední rozsah:	produkt aferézy
Vysoký rozsah:	produkt aferézy

Tyto vzorky byly rozděleny do tří alikvotů a každému ze tří operátorů byl poskytnut jeden alikvot každé hladiny (nízká, střední, vysoká). Z každého alikvotu byly připraveny vzorky (n = 10) podle pokynů na příbalovém letáku k balíku se soupravou reagentů Stem-Kit. Každý operátor prováděl analýzu na průtokovém cytometru EPICS XL s použitím automatického a ručního gatování a analýzy s cílem stanovit hodnoty CD45+, CD34+ a CD34 %. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procentní podíl (%) celkového počtu leukocytů a jako absolutní počet (buněk/μl).

Výsledky studie mezilaboratorní přesnosti jsou uvedeny v následujících tabulkách podle jednotlivých úrovní. Hodnoty zjištěné pro absolutní počty CD45+ a CD34+ a pro procentní podíly CD34 vykazovaly drobné rozdíly, což bylo prokázáno středními hodnotami, směrodatnými odchylkami a variačními koeficienty pro replikovaná měření.

Graf je uveden v příloze.

Vnitrolaboratorní přesnost

Vzorky pokrývající dynamický rozsah rozboru byly získány s použitím čerstvých vzorků periferní plné krve, čerstvých vzorků kostní dřeně a čerstvých a rozmrazených produktů aferézy a vzorků pupečnickové krve ze čtyř externích hodnoticích pracovišť. Z každého z nich bylo připraveno deset vzorků podle pokynů na příbalovém letáku k balíku reagentů sady Stem-Kit a byla provedena analýza na průtokových cytometrech COULTER EPICS XL/XL-MCL s použitím ručního gatování a analýzy s cílem zjistit hodnoty CD45+, CD34+ a CD34 %.

Hodnoty pro CD45+, CD34+ a CD34 % uvedené v následujících tabulkách demonstrují, že metodu analýzy lze reprodukovat, jak je prokázáno středními hodnotami, směrodatnými odchylkami a variačními koeficienty pro tato měření. V tabulkách dat uvedených v příloze je demonstrována vnitrolaboratorní přesnost pro příslušný rozbor.

Graf je uveden v příloze.

OMEZENÍ

Pokud používáte automatickou metodu, vyhledejte informace o omezeních v příručce stemCXP System Guide (Pokyny k systému stemCXP), dodávané se systémovým softwarem stemCXP.

- Obarvené a lyzované vzorky je třeba skladovat na ledu a analyzovat v průtokovém cytometru podle informací v části „Stabilita zpracovaného vzorku“, jinak mohou být výsledky chybné.
- Reagencie neředěte, nepřipravujte z nich alikvoty ani je nezmrazujte. Používejte je pouze v původním obalu.
- Reagencie jsou určeny pouze pro průtokovou cytometrii.
- Zmrazené vzorky řádně rozmrazte, aby bylo zajištěno optimální obarvení.
- Za následujících podmínek nemusí proběhnout lýza všech červených krvinek: přítomnost červených krvinek s jádrem, abnormální koncentrace proteinů nebo hemoglobinopatie. V těchto případech mohou vzniknout falešně nízké výsledky CD34 % kvůli nelyzovaným červeným krvinkám, které budou sčítány jako leukocyty. Na absolutní počty CD34+ a CD45+ by tato situace neměla mít vliv.
- Někteří pacienti mohou být zvláště problematictí kvůli změněnému nebo velmi nízkému počtu určitých populací buněk.
- Výsledky získané průtokovou cytometrií mohou být chybné, pokud jsou nesprávně nastaveny vymezené oblasti (gate).
- Reagencie v soupravě Stem-Kit jsou určeny pro použití barviva 7-AAD pro určení životnosti buněk s cílem určit hematopoetické progenitorní buňky (HPC) se životností. Pokud vaše laboratoř používá alternativní metodu určování životnosti, postupujte podle obecných zásad správné laboratorní praxe a podle procedur vaší laboratoře pro kontrolu kvality, aby byla zajištěna kvalita zjištěných výsledků.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Beckman Coulter, stylizované logo a známky produktů a služeb společnosti Beckman Coulter uvedené v tomto dokumentu jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Beckman Coulter, Inc. ve Spojených státech amerických a dalších zemích.

DALŠÍ INFORMACE

www.beckmancoulter.com

Klíč k symbolům

Slovníček symbolů je k dispozici na adrese beckman.com/techdocs (číslo dokumentu B60062)

Stem-Kit Reaktifleri

REF IM3630 50 test

In Vitro Diagnostik Kullanım içindir

KULLANIM AMACI

Stem-Kit Reaktifleri iki renkli floresan (FITC, PE) fare monoklonal antikor reaktifi, iki renkli fare floresan (FITC, PE) izoklonik kontrol, mutlak sayım reaktif, hücre viyabilite reaktif ve parçalama reaktifinden oluşur. Biyolojik numunelerde CD45+ ve ikili pozitif CD45+ CD34+ hücre popülasyonu yüzdelерinin ve mutlak sayımlarının akış sitometrisi ile eşzamanlı tanımlanması ve sayımında “In vitro diagnostik kullanım için” tasarlanmıştır. Biyolojik numuneler arasında taze, normal veya mobilize periferik tam kan ve taze veya çözöürölmüş aferez ürünleri, kordon kanı ve kemik iliğı bulunur. Hücre popülasyonu ölçömleri, kapılama ve analiz için otomatik veya manuel yöntem kullanılarak elde edilebilir.

Manuel yöntemi kullanıyorsanız talimatların tamamı için bu Stem-Kit Reagents prospektüsüne bakın. Otomatik yöntemi kullanıyorsanız talimatların tamamı için stemCXP 2.0 yazılım kiti ve stemCXP sürüm 2.0, WIN 7 ile verilen stemCXP System Guide'a (stemCXP Sistem Kılavuzu) bakın.

ÖZET

Hematopoietik Progenitör Hücreler (HPC)

Stem-Kit Reaktifleri aşğıdaki kriteri kullanarak insan hematopoietik progenitör hücrelerini (HPC) tanımlamak üzere tasarlanmıştır: “Gerçek CD34+ hücreleri (a) CD34 antijenini eksprese eder, (b) CD45 antijenini öncü hücrelerin boyama yoğunluğu özelliğı ile eksprese eder (yani kolayca algılanabilir ancak lenfosit ve monositlerden daha düşük seviyelerde) ve (c) öncü hücrelerin düşük yan aç ve düşük ila ara ileri aç ışık yayılım özelliklerini sergiler” (1). Ölü CD34+ HPC'nin canlı CD34+ HPC sayısının dışında bırakılması 7-AAD Viyabilite Boyası ile elde edilir (2).

CD34

CD34 antijeni kademeli olarak glikosilatlanan tip I transmembran tek zincir glikoprotein familyasıdır (3, 4, 5). Multipotent kök hücreler dahil neredeyse tüm hematopoietik prekürsör hücrelerde eksprese edilir. CD34 epitopları neuraminidaz ve Pasteurella hemolitik glikoproteaz duyarlılığına dayanarak üç sınıfa ayrılmıştır (6). Stem-Kit Reaktifleri içinde kullanılan CD34 monoklonal antikor (mAb) 581 olarak adlandırılır. Enzimatik bölünme paternleriyle (6, 8) tanımlandığı üzere özellikle CD34 molekülünün sınıf III epitopunu (7) tanır. Bu 581 monoklonal antikor CD34'e 1993 yılında Boston, Massachusetts, ABD'deki 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5. HLDA İnsan Lökosit Farklılaşma Antijenleri) seminerinde atanmıştır (7).

CD45

CD45 antikor pan lökosit antijenlerinin CD45 familyasının 180, 190, 210 ve 220 kD moleküler ağırlığa sahip üyelerini tanır (9, 10, 11). Ayrıca lökosit genel antijeni (LCA) olarak tanınmaktadır. CD45 antijeni olgun eritrositler ve mevcut progenitörleri haricinde her hematopoietik hücre türünde eksprese edilir (11, 12). Farklılaşmış hematopoietik olmayan dokuda saptanmamıştır (12, 13, 14, 15). Stem-Kit reaktiflerinde kullanılan CD45 mAb, J33 olarak adlandırılır. 1986 yılında Oxford, İngiltere'de düzenlenen 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens'de (İnsan Lökosit Diferansiyasyon Antijenleri ile ilgili 3. HLDA Çalıştay) CD45'e atanmıştır (16).

7-AAD

7-Amino-Aktinomis D (7-AAD) Viyabilite Boyası, kromofor konumu 7'de ikame edilen bir amino grubu içeren aktinomis D analogudur. 7-AAD Viyabilite Boyası DNA'nın sitozin ve guanin bazları arasına eklenir (15). Aktinomis D 2-amino-4, 6 dimetilfenoksazon-3 kromofor ve iki siklik pentapeptit içeren biyolojik olarak aktif bileşiklerdir (17). Aktinomis D çift sarmal deoksiribonükleik asitle (DNA) stabil kompleksler oluşturur, ancak çift sarmal ribonükleik asitle (RNA), RNA-DNA hibritleriyle veya tek sarmal DNA veya RNA ile oluşturmaz (15, 18).

7-AAD Viyabilite Boyasının spektral özellikleri bu molekülü akış sitometrisi analizi için özellikle uygun kılar (17). 7-AAD/DNA kompleksinin maksimum emilimi yeşil spektral bölgede bulunmaktadır ve dolayısıyla argon lazer donanımlı sitometreye (eksitasyon dalga boyu 488 nm) uygundur (15). Propidyum iyodürün (PI) aksine 7-AAD/DNA kompleksi floresin izotiosiyanat (FITC) ve fikoeritrin (PE) ile minimum spektral çakışma sergilediğı için, 7-AAD Viyabilite Boyasının koyu kırmızı floresans emisyonu (635 ila 675 nm) bu probun kullanımını FITC ve PE konjuge antikorlarla daha kolay hale getirir (17).

Apoptotik, nekrotik hücreler ve/veya hasarlı hücreler akış sitometrisi ile canlı hücre analizinde etkileşim kaynaklarıdır. Cansız hücreler, canlı hücrelerin boyanmadan (negatif) kaldığı 7-AAD-pozitif boyamaya odaklanarak değerlendirilip ayırt edilecektir (19).

Akış Sitometresi Sistemleri

Akış sitometresi sistemleri (FC 500) spesifik monoklonal antikorlar ve kullanılan florokromlarla saptanan çeşitli hücre popülasyonlarının tanımlanması için biyolojik numunelerin analiz edilmesinde akış sitometrisi prensiplerini uygular. Mevcut test, örnekleri analiz etmek için CXP Sistem Yazılımı içeren FC 500 akış sitometresi sistemlerini kullanır.

İLKE

Bu test monoklonal antikorun ayrık antijenik determinantını eksprese eden hücre yüzeylerine bağlanma becerisine dayanmaktadır. Stem-Kit Reaktiflerinin içindeki CD45-FITC / CD34-PE reaktifi, her biri belirli bir fluorokroma konjuge ve farklı bir hücre yüzeyi antijeni için spesifik olan iki fare monoklonal antikorunun birleşimidir. Spesifik hücre yüzeyi boyaması, biyolojik bir numunenin tekrarlanan örneklerinin iki renkli CD45-FITC / CD34-PE reaktifi ile inkübe edilmesi ile gerçekleştirilir.

Aynı örneğin ilave bir testi CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reaktifi ile boyanarak CD34-PE monoklonal antikorunun non-spesifik bağlanması kontrol edilir. Canlı ve cansız hücreleri ayırt etmek için, erişilebilir baz çiftlerine (hücre DNA) bağlanan bir nükleik asit boya olan 7-AAD Viyabilite Boyası kullanılır. Her örnekteki kırmızı kan hücreleri 1X'de hazırlanan NH₄Cl Parçalama Çözeltisi ile parçalanır. Stem-Count Fluorospheres veya Flow-Count Fluorospheres (mutlak sayım reaktifi) eklenir ve kalan hücreler akış sitometrisi ile analiz edilir. Testin işlem kontrolü ve kalite kontrolü cihazla ve örneğin kalite kontrol reaktifleriyle sağlanır: Flow-Check Fluorospheres, Flow-Set Fluorospheres, uygun kompanzasyon reaktifleri ve Stem-Trol Control Cells.

KLİNİK UYGULAMA ÖRNEKLERİ

Hematopoietik progenitör hücrelerin (HPC) bilimsel raporlarının kronolojisi, erken çalışmaların kantifikasyon için çekirdekli hücre sayımlarına dayandığını gösterir. Koloni oluşturan birim (CFU) testlerini içeren sonraki çalışmalar, progenitör hücre popülasyonlarının kabaca yaklaşık sayısını vermiştir. Zaman yoğun CFU testlerini CD34 hücre yüzeyi molekülünün keşfi izlemiştir. CD34'ün kemik iliği ile periferik kandaki erken hematopoietik hücrelerin ve hematopoietik koloni oluşturan hücrelerin yüzeyinde bulunduğu görülmüştür (20). CD34 molekülüne yönelik monoklonal antikorlar daha sonra akış sitometresinde geliştirilip kullanılmıştır. Akış sitometrisiyle CD34 saptamaları, hematopoietik progenitör ve kök hücrelerini değerlendirme yolu olarak geniş kabul görmektedir.

Normal bireylerin kemik iliğinde CD34 antijeni eksprese eden hücrelerin %1 ila 3'ü uzun vadeli çoklu soy hematopoiez sulandırma becerisine sahiptir (3, 20). Normal bireylerin periferik kanında dolaşımdaki hücrelerin %0,1'inden azı CD34 antijenini eksprese eder (1, 21). Stem-Kit reaktifinin kullanımı, periferik kan, lökoferez ürünleri, kemik iliği ve kordon kanında hematopoietik progenitör ve kök hücrelerin sayımı için basit, hızlı ve duyarlı bir akış sitometrik yöntemi sağlar.

REAKTİF İÇERİĞİ

Stem-Kit Reaktifleri aşağıdakileri kapsar:

- CD45-FITC / CD34-PE Reaktifi (45/34) – 1 flakon.
- CD45-FITC/IsoClonic Control-PE Reaktifi (45/CTRL) – 1 flakon.
- Stem-Count Florosferleri – 1 flakon.
- 7-AAD Viyabilite Boyası – 1 flakon.
- 10X NH₄Cl Parçalama Çözeltisi – 2 flakon.

1. Bu reaktifler kitte verildiği gibi set olarak kullanılmalıdır.

Stem-Count Florosferleri ile eşdeğer olan Flow-Count Florosferleri, test edilen spesifik konsantrasyon kullanılıyorsa mutlak sayım saptamasında kullanılabilir.

2. CD45-FITC / CD34-PE, koruyucu olarak 2 mg/mL sığır serum albümini (BSA) ve %0,1 sodyum azid içeren 2,2 mL fosfat tamponlu salinle (PBS) verilen kullanıma hazır iki renkli bir reaktiftir.
3. CD45-FITC/IsoClonic Control-PE, koruyucu olarak 2 mg/mL BSA ve %0,1 sodyum azid içeren 1,2 mL PBS içinde verilen kullanıma hazır iki renkli bir reaktiftir. CD45-FITC/IsoClonic Control-PE reaktifi konjuge olmayan ve PE konjuge (CD34 benzer) 581 monoklonal antikorun karışımıdır. Bu karışım CD34-PE mAb'ın her bir örneğe spesifik olmayan bağlanmasını kontrol eden uygun, izomorfolojik kontrol görevini görür.

NOT: CD45-FITC / CD34-PE ve CD45-FITC/IsoClonic Control-PE reaktifleri ayrılmamalıdır. Testler ve kontroller yapılırken her iki reaktifin flakon etiketinde aynı lot numarasının olmasına dikkat edilmelidir.

Antikor özelliklerinin özeti

Özgüllük	CD45	CD34
Klon	J33	581
Hibridoma	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
İmmünojen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Zinciri	IgG1, κ hafif zincirleri	IgG1, κ hafif zincirleri
Türler	Fare	Fare
Konjugasyon	Floresin izotiyosiyanat (FITC)	R Fikoeitritin (PE)
Molar oran	5-8 mol FITC/mol Ig	0,5-1,5 mol PE/mol Ig

Özgüllük	CD45	CD34
Eksitasyon dalga boyu	488 nm (mavi-yeşil)	488 nm (mavi-yeşil)
Floresans emisyonu	504 ila 541 nm (daha çok yeşil)	568 ila 590 nm (daha çok turuncu)

4. Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferleri 20 mL sulu süspansiyon ortamında bir yüzey aktif madde ve %1 formaldehid içeren 10 µm (nominal çap) polistiren floresan mikrosferden oluşmaktadır. Her floresfer, 488 nm'de uyarıldığında 525 nm ila 700 nm floresans emisyon aralığına sahip bir boya içerir. Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferleri test edilmiş konsantrasyonu (floresferler/µL) COULTER partikül boyutu analizörü ile çoklu kopya analizinden elde edilir. Lota özgü değer şişe etiketinde belirtilir.
5. 7-AAD Viyabilite Boyası %99 fosfat tamponlu salinde (PBS: 0,01 M sodyum fosfat, 0,145 M sodyum klorür, pH 7,2) %1 dimetil sülfoksitle (DMSO) sağlanır.
6. NH₄Cl Parçalama Çözeltisi, 10X konsantre 20 mL çözelti olarak sağlanır. Amonyum klorür (NH₄Cl), potasyum bikarbonat (KHCO₃), Disodyum Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) karışımından oluşmaktadır.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. Monoklonal antikor preparatları %0,1 sodyum azid içerir. Sodyum azid asidik koşullar altında son derece zehirli bir bileşik olan hidrazoik asit üretir. Kanalizasyon sistemine boşaltılırken bol miktarda su akıtılarak metal borularda tehlikeli birikim ve potansiyel patlamalar önlenmelidir.
2. Örnekler, numuneler ve bunlara temas eden tüm malzemeler enfeksiyon bulaştıracabileceklermiş gibi kullanılıp uygun önlemler alınarak atılmalıdır.
3. Asla ağızla pipetleme yapmayın ve örnek veya reaktiflerin cilt ve mukus membranlarına temas etmesini önleyin.
4. Reaktifleri şişe etiketi üzerindeki son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
5. Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferleri'nde %1 formaldehid bulunur. Formaldehit bu dokularda kalıcı etkilere neden olabileceğinden deri ve gözler ile temasından sakının. Buharları solumayın. Eldiven ve göz koruması gibi uygun koruyucu ekipman kullanın.
6. Stem-Kit Reaktifleri saklama veya kullanım sırasında güçlü ışığa veya ısıya maruz kalmamalıdır.
7. Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferlerinin buharlaşmasını ve sızıntısını önleyin, aksi halde hatalı sonuçlar ortaya çıkabilir. Flakonları kullandıktan sonra kapaklarını sıkıca kapatıp dik olarak muhafaza edin.
8. Kullanımdan önce floresferlerin tamamen yeniden süspansiyon haline geldiğinden emin olun. Hava kabarcığı oluşumunu en aza indirmek için aşırı karıştırmadan kaçının. Hava kabarcıklarını pipetlemeyin aksi halde hatalı sonuçlar oluşabilir.
9. Örnek ve Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferleri dağıtmak için kalibre edilmiş bir pipet (pozitif yerleştirme veya tekrarlama pipeti tercih edilir) kullanın, aksi halde hatalı sonuçlar ortaya çıkabilir.
10. Örnek ve Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferlerinin doğru ve kesin olarak pipetlendiğinden emin olmak için pipet üreticisi tarafından önerilen pipetleme tekniklerini kullanın; aksi takdirde hatalı sonuçlar oluşabilir.
11. Boyalı ve parçalanmış örnekler, "İşlenmiş Örnek stabilitesi" bölümündeki bilgilere göre buzda saklanıp akış sitometresinde analiz edilmelidir, aksi halde hatalı sonuçlar ortaya çıkabilir.
12. En az 1.000 Stem-Count Floresferi veya Flow-Count Floresferi sayıldığından emin olun, aksi halde sonuçlar mutlak sayımlara otomatik olarak dönüştürülmez.
13. Her Stem-Count Floresferi veya Flow-Count Floresferi lotu belirli bir floresfer konsantrasyonuna sahiptir. Mutlak sayım sonuçlarını tayin ederken test edilen doğru konsantrasyon değerinin kullanıldığından emin olun.
14. Bilinmeyen hücre kaybından dolayı, yıkama adımı gerektiren hazırlama yöntemleri kullanılmamalıdır.
15. Belirtilenler dışında inkübasyon veya karıştırma sürelerinin ya da sıcaklıkların kullanılması hatalı sonuçlar verebilir.
16. 7-AAD Viyabilite Boyası %0,005 7-AAD içerir. Saf 7-AAD potansiyel bir karsinojendir. Bu bileşik oldukça seyreltilmiş olsa da, cilt ve gözlerle temas etmemesini, uygun koruyucu giysi ve eldiven ve uygun yüz/göz koruması kullanılmasını öneririz.
17. 7-AAD Viyabilite Boyası %1 Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerir. Saf DMSO, tahriş edicidir. Bu bileşik seyreltilmiş olsa da, cilt ve gözlerle temas etmemesini, uygun koruyucu giysi ve eldiven ve uygun yüz/göz koruması kullanılmasını öneririz.
18. 7-AAD, kromofor olarak ışığa karşı duyarlıdır. 7-AAD Viyabilite Boyasını kitin karton ambalajında saklayın ve saklama sırasında sürekli ışığa maruz kalmasını önleyin.
19. İnkübasyon sırasında karışık örneklerin ışığa maruz kalmasını en az düzeye indirin.
20. Reaktiflerle çalışırken genel iyi laboratuvar uygulamalarını kullanın.

GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

Stem-Count Florosferler

TEHLİKE



H316
H317
H350
P201

Hafif cilt tahrişine yol açar.
Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar.
Kansere yol açabilir.
Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.
P280
Koruyucu eldiven, koruyucu kıyafet ve göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P308+P313
Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın.
P333+P313
Ciltte tahriş veya kaşıntı söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.
P362+P364
Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın.
Formaldehid 0,5 - %1,0
reaksiyon kütlesi:
5-kloro-2-metil-4-izotiazolin
-3-one [EC# 247-500-7] ve
2-metil-4-izotiazolin-3-one [EC# 220-239-6] (3:1) < %0,05

7-AAD Viyabilite Boyası

UYARI

H316
P332+P313

Hafif cilt tahrişine yol açar.
Ciltte tahriş söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.
Dimetil Sülfoksit 0,5 - %2



Güvenlik Veri Sayfası beckman.com/techdocs adresinde bulunabilir

SAKLAMA KOŞULLARI VE STABİLİTE

Açılmamış reaktif, ışısız ortamda 2-8°C'de saklandığında flakonun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Dondurmayın. Stem-Kit Reaktifleri, Stem-Count Florosferleri veya Flow-Count Florosferleri flakonu açıldıktan sonraki 30 gün stabil kalır. Açılan flakonların kapağı kullanımdan hemen sonra tekrar kapatılmalı ve flakonlar ışısız ortamda 2-8°C'de saklanmalıdır. Stem-Count Florosferleri veya Flow-Count Florosferlerinin orijinal flakonundan ÖRNEK AYIRMAYIN.

ÖNEMLİ: Stem-Count Florosferleri veya Flow-Count Florosferleri sızıntısı halinde hatalı sonuç riski doğar. Stem-Count Florosferleri veya Flow-Count Florosferleri açıldıktan sonra sızma olasılığını önlemek için dik bir konumda saklanmalıdır. Sızıntı belirtileri gözlemlenirse reaktifler kullanılmamalıdır.

Bozulma Göstergesi

Aşağıdaki durumlarda bozulma kanıtları görülebilir:

Stem-Kit Reaktifleri, Stem-Count Florosferleri hariç

- Normal görünüşte aşağıda belirtilen değişiklik

Reaktif	Normal Görünüş
CD45-FITC / CD34-PE	Berrak, pembemsi sıvı
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Berrak ila pembemsi sıvı
7-AAD Viyabilite Boyası	Berrak, hafif pembe ila kırmızımsı sıvı
NH ₄ CL Parçalama Çözeltisi	Berrak, renksiz sıvı

Stem-Count Fluorospheres

- Toplam florosfer popülasyonunun %20'sinden fazlasını içeren sekonder floresan popülasyonların veri edinme sırasındaki görünüşü.
- Sayım veya örnekler için elde edilmiş değerlerde büyük değişiklik.

ÖNEMLİ: Yanlış sonuçlar alınabileceğinden, bozulma kanıtı varsa reaktifler kullanılmamalıdır. Bozulma kanıtı varsa bölgenizdeki Beckman Coulter Temsilcisini arayın.

Reaktifin Hazırlanması

1. CD45-FITC / CD34-PE ve CD45-FITC/IsoClonic Control-PE iki renkli reaktifler herhangi bir seyreltme olmaksızın doğrudan flakondan kullanılır.
2. Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferleri herhangi bir seyreltme olmaksızın doğrudan flakondan kullanılır. Sıcak mühürdeki alüminyumun tamamı, ilk açıldığında şişenin üstünden temizlenmelidir. Uygun karışımlar gerekmektedir. Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferleri flakonu günün başında ilk kez kullanılırken, 3-5 saniye vorteksleyin.
Flakondan pipetlemeden önce flakonu 3-5 kez çevirerek hafifçe çalkalayın.
Gün başlangıcındaki ilk vortekslemenin ardından floresferlerin flakonunu kullanılana kadar 2-8°C'ye getirin.
Kullandıktan sonra flakonun kapağını sıkıca kapatarak buharlaşma ve sızıntıyı önleyin.
3. 7-AAD Viyabilite Boyası flakondan doğrudan, dilüsyon olmaksızın kullanılır.
4. 1X NH₄Cl Parçalama Çözeltisi günlük olarak hazırlanmalıdır: dokuz deiyonize su hacmini bir 10X konsantre NH₄Cl Parçalama Çözeltisi hacmine ekleyin. Soğutucuya koymayın. Gün bitiminde kullanılmayan 1X NH₄Cl Parçalama Çözeltisini atın.

Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına (18-25°C) getirin.

NUMUNE İŞLEME

Örnek Gereksinimleri

Numune işleme özeti:

Numune Türü	Geçit Yöntemi	Depolama Sıcaklığı	Numune Yaşı
Aferez	Algoritma	2-8°C	24 Saat
	Manuel	2-8°C	24 Saat
Kemik İliği	Algoritma	2-8°C	24 Saat
	Manuel	2-8°C	24 Saat
Kordon Kanı	Algoritma	18-25°C	24 Saat
	Manuel	18-25°C	24 Saat
Normal Tam Kan	Algoritma	18-25°C	20 saat
	Manuel	18-25°C	20 saat
Mobilize Tam Kan	Algoritma	18-25°C	20 saat
	Manuel	18-25°C	20 saat

1. Biyolojik numuneler arasında taze, normal veya mobilize periferik tam kan ve taze veya çözdürülmüş aferez ürünleri, kordon kanı ve kemik iliği bulunur.
2. İşlenmiş veya saflaştırılmış hematopoietik progenitör hücreleri (HPC) sadece manuel kapılama yöntemiyle analiz edilebilir.
3. Aferez ürünlerini, periferik kan numunelerini, kordon kanı numunelerini veya kemik iliği numunelerini boşaltılmış steril bir kan alma tüpüne KHA formül A veya K3 EDTA antikoagülanla aseptik olarak alın.
4. Antikoagülan tüplerde toplanan tam kan ve mobilize tam kan numuneleri boyanmadan önce oda sıcaklığında (18-25°C) 20 saate kadar saklanabilir.
5. Antikoagülan tüplerde toplanan kordon kanı numuneleri boyanmadan önce oda sıcaklığında (18-25°C) 24 saate kadar saklanabilir.
6. Toplanan Aferez ürünleri ve Kemik İliği numuneleri boyanmadan önce 2-8°C'de 24 saate kadar saklanabilir.
7. Örnek hazırlama öncesinde beyaz kan hücresi (WBC) konsantrasyonunun 30 x 10⁹ WBC hücre/L'den yüksek olmamasını sağlayın. Gerekirse, örneği HBSS veya eşdeğeri ile seyrelterek ortalama 15 x 10⁹ WBC hücre/L değerini elde edin. Nihai HPC mutlak sayımının hesaplanması için dilüsyon faktörünü kaydedin.
8. Düşük protein konsantrasyonları Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferlerinin topaklaşmasına yol açarak hatalı şekilde yüksek mutlak hücre sayımı verebilir. Düşük protein konsantrasyonuna sahip numunelerin dilüsyonu protein açısından zengin bir tamponla gerçekleştirilmelidir.
9. Tüm numuneler 7-AAD Viyabilite Boyası dahil Stem-Kit Reaktifleriyle işlenmelidir.

Numune İşleme Prosedürü

Testleri ikili olarak, "The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry" (Akış Sitometrisi ile CD34+ Hücre Determinasyonuna Yönelik ISHAGE Yönergeleri) gereğince gerçekleştirin (1).

NOT: Stem-Trol Kontrol Hücrelerinin işlenmesi için manuel yöntemi kullanıyorsanız talimatların tamamı için Stem-Trol Kontrol Hücreleri prospektüsüne bakın. Otomatik analiz yöntemi kullanıyorsanız talimatların tamamı için stemONE Sistem Yazılımıyla verilen stemONE System Guide'a (Sistem Kılavuzu) veya stemCXP Sistem Yazılımıyla verilen stemCXP System Guide'a (Sistem Kılavuzu) bakın.

- Her numune örneği için üç tüpü aşağıdaki gibi etiketleyin:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
- 45/34/7-AAD #1 ve 45/34/7-AAD #2 tüplerine 20 µL CD45-FITC / CD34-PE Reaktif pipetleyin.
- 45/CTRL/7-AAD tüpüne 20 µL CD45-FITC/IsoClonic Control-PE Reaktifini pipetleyin.
- Tüm tüplere 20 µL 7-AAD Viyabilite Boyası pipetleyin.

ÖNEMLİ: Kan numunesi test tüpünün üstünde veya yanında kalırsa eksik parçalama riski oluşur. Kanın test tüpünün üst veya yan kısmına temas etmesini engellemek için pipetleme sırasında dikkatli olun. Gerekirse, tüpü pamuklu bir çubukla temizleyerek test tüpünün üst veya yan kısmında kalan tüm kan numunesi izlerini ortadan kaldırın.

- Pozitif yerleştirme pipeti veya tekrarlama pipeti kullanarak 100 µL hasta örneğini tüpe pipetleyin.
- Derhal tüpü 5 saniye vorteksleyin.
- Tüm tüpleri oda sıcaklığında (18-25°C) ışıktan koruyarak 20 dakika boyunca inkübe edin.
- İnkübasyonun ardından her tüpe 2 mL hazırlanmış 1X NH₄Cl Parçalama Çözeltisi ekleyin ve vakit geçirmeden 5 saniye boyunca vorteksleyin.

NOT: Parçalama Çözeltisi hazırlama bilgileri için yukarıda REAKTİF HAZIRLIĞI başlıklı 7.2 bölümüne bakın.

ÖNEMLİ: Hava kabarcıkları pipetlenirse hata sonuç riski oluşabilir. Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferlerinin gereğinden fazla karıştırılması hava kabarcıkları oluşturabilir. Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferlerini gereğinden fazla karıştırmayın ve örnek tüplerine hava kabarcıkları pipetlemeyin.

- Oda sıcaklığında ışıktan koruyarak 10 dakika boyunca inkübe edin.
- Kullanmadan önce şişeyi 3 ila 5 kez ters çevirerek Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferleri'ni hafifçe karıştırın.
- Alım öncesinde ve 9. adımın hemen ardından, pozitif yerleştirme veya tekrarlama pipeti kullanarak üç tüpten her 100 µL Stem-Count Floresferleri veya Flow-Count Floresferleri pipetleyin.
- Her tüpü derhal 5 saniye boyunca vorteksleyin.

NOT: Parçalama Çözeltisi hazırlama bilgileri için yukarıda REAKTİF HAZIRLIĞI başlıklı 7.2 bölümüne bakın.

Numune Boyama Özeti

Reaktifler/Örnekler	45/34/7-AAD #1	Test Tüpü Etiketi 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD Viyabilite Boyası	20 µL	20 µL	20 µL
Numune	100 µL	100 µL	100 µL
Vorteks – 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edin. Işıktan koruyun.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vorteks – 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edin. Işıktan koruyun.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Vorteks			

Reaktifler/Örnekler	45/34/7-AAD #1	Test Tüpü Etiketi 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
Toplanan Aferez ürünleri, Kordon Kanı örnekleri ve Kemik İliği örnekleri için alım öncesinde buzda 60 dakikadan fazla bekletmeyin.			
Tam kan ve mobilize tam kan örnekleri için, alım öncesinde buzda 45 dakikadan fazla bekletmeyin.			
Çözünen örneği derhal analiz edin.			
Işıktan koruyun			

İşlenmiş Örnek stabilitesi:

- Toplanan Aferez ürünleri, Kordon Kanı örnekleri ve Kemik İliği örnekleri için, Stem-Count veya Flow-Count floresferlerini ekledikten sonra, alım öncesinde buzda 60 dakikadan fazla bekletmeyin.
- Tam kan ve mobilize tam kan örnekleri için, Stem-Count veya Flow-Count floresferleri eklendikten sonra, alım öncesinde buzda 45 dakikadan fazla bekletmeyin.
- Dondurulmuş örnek alımı, Stem-Count veya Flow-Count floresferlerinin eklenmesinden hemen sonra yapılmalıdır.
- İşlenmiş numuneler ışıktan korunmuş buzda saklanmalı ve alım sırasında RT maruziyetini mümkün olduğunca sınırlandırmalıdır.

İÇİNDEKİLER

Sodyum azid koruyucu maddesi metal kanalizasyon hatlarında patlayıcı bileşimler oluşturabilir. NIOSH Bültenine bakın: Explosive Azide Hazard (Patlayıcı Azide Tehlikesi) (16.8.76).

Azid bileşenlerinin olası birikimini engellemek amacıyla, seyreltilmemiş reaktifi çöpe attıktan sonra atık borularını bol suyla yıkayın. Sodyum azid, uygun yerel düzenlemelere göre çöpe atılmalıdır.

GEREKLİ OLAN ANCAK KİT İLE BİRLİKTE VERİLMİYEN MALZEMELER:

1. Deiyonize su.
2. Hank Dengeli Tuz Çözeltilisi (HBSS) veya eşdeğeri
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Stem-Count Fluorospheres'e alternatif olarak: Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
9. Buzlu su banyosu
10. Plastik test tüpleri (12 x 75 mm)
11. Kalibre edilmiş tekrarlama pipeti (20 µL, 100 µL, 2 mL) ve uçları veya kalibre edilmiş pozitif yerleştirme pipetleri (20 µL, 100 µL, 2 mL) ve uçları
12. Kalibre edilmiş standart pipet (20 µL, 100 µL, 2 mL) ve uçları
13. Vorteks karıştırıcı.
14. Süre ölçer.
15. Akış sitometresi.
16. stemCXP 2.0 yazılım kiti, stemCXP sürüm 2.0, WIN 7, YALNIZCA CXP Yazılımı (Sürüm 2.0) bulunan FC 500 akış sitometresi sisteminde örneklerin otomatik analizi içindir.

SONUÇLAR

Analiz Protokolü Ayarı

Akış sitometresi; ileri yayılım, yana yayılım ve dört floresans kanalını algılayacak donanıma sahip olmalıdır. FL3 kanalı için (Stem-Count veya Flow-Count Floresferlerini izleme için) 620 nm bant geçiş filtresi kullanın. FL4 kanalı için (7-AAD Viability Dye izleme için) 675 nm uzun geçiş filtresi kullanın.

Akış sitometresinin floresans yoğunluğu için uygun biçimde hizalanıp standartlaştırılmasını sağlayın.

9.2.3 Akış sitometresinin floresans kompensasyonu için doğru ayarlandığından emin olunuz.

NOT: Numune analizinde, tüm bölge pozisyonları 45/34/7-AAD #1 tüpü veri edinme sonuna kadar yaklaşıktır. Bölgeler aşağıdaki protokole göre optimize edilir ve sonra paneldeki ikinci ve üçüncü tüp için AYARLANMAZ.

Numune analizi için 8 histogramlık bir dizi ve kapılama planına uyulmalıdır (aşağıya bakın). CD34+ kontrol hücreleri kullanılırken aynı 8 histogramlık dizi ve kapılama planına uyulmalıdır. A, B, C ve D bölgeleri (bölge tanımı için “Bölge Oluşturma” başlığına bakın) CD34+ kontrol hücrelerinin özellik kümesini içerecek şekilde ayarlanacaktır.

Histogram Oluşturma

Histogramları aşağıdaki gibi oluşturun:

1. FL1 CD45-FITC'ye karşılık Yana Yayılım olarak Histogram 1'i oluşturun.
2. FL2 CD34-PE'ye karşılık Yana Yayılım olarak Histogram 2'yi oluşturun.
3. FL1 CD45-FITC'ye karşılık Yana Yayılım olarak Histogram 3'ü oluşturun.
4. İleri Yayılıma karşılık Yana Yayılım olarak Histogram 4'ü oluşturun.
5. FL1 CD45-FITC'ye karşılık FL2 CD34-PE olarak Histogram 5'i oluşturun.
6. İleri Yayılıma karşılık Yana Yayılım olarak Histogram 6'yı oluşturun.
7. Süreye karşılık FL3 Stem-Count veya Flow-Count Florosferleri olarak Histogram 7'yi oluşturun.
8. FL4 7-AAD Viyabilite Boyası'na karşılık Yana Yayılım olarak Histogram 8'i oluşturun.

1 ile 4 arasındaki histogramlar, analiz adımı kadar ertelenebilecek CD34+ HPC işlemini karakterize etmeye yöneliktir. Bu ilk dört histogram, ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry'ye (Akış Sitometrisi ile CD34+ Hücre Determinasyonuna Yönelik ISHAGE Yönergeleri) (1,2) uygun olarak ayarlanır. Histogram 5 ile 7, edinme adımı sırasında önemli olan parametreleri izlemeye yöneliktir. Bunlar ileri yayılım ayırıştırıcısını, toplanacak CD45+ olaylarının sayısını ve doğru florosfer singlet birikimini içerir.

Histogram 8, uygulanabilir olayları uygulanamaz olaylardan ayırt etmeye yöneliktir.

Bölge Oluşturma

Bölgeleri aşağıdaki gibi hazırlayınız:

1. Histogram 1 – Histogram 1 üzerinde Tüm CD45+ lökositlerini içeren ve trombositleri, kırmızı kan hücreleri birikintilerini ve agregatları ortadan kaldıran doğrusal bir A Bölgesi oluşturun.
2. Histogram 1 – Histogram 1 üzerinde lenfositleri içeren şekilsiz bir E Bölgesi oluşturun (parlak CD45, düşük yana yayılım).
3. Histogram 2 – Histogram 2 üzerinde tüm CD34+ olaylarını içeren doğrusal bir B Bölgesi oluşturun. Histogram 2'de 75.000 olaylık (CD45+ olayları) bir durdurma sayısı ayarlayın.
4. Histogram 3 – Histogram 3 üzerinde kümelenmiş tüm CD45dim olaylarını içeren şekilsiz bir C Bölgesi oluşturun.
5. Histogram 4 – Histogram 4 üzerinde ara yan saçılma ve ara ila yüksek ileri saçılma ile tüm kümelenmiş olayları içerecek şekilsiz bir D Bölgesi oluşturun.
6. Histogram 5 – Histogram 5 üzerinde CD34+ olaylarındaki CD45 ekspresyonunun alt limitini doğrulamak üzere bir Quadstat I Bölgesi oluşturun.
7. Histogram 5 – Histogram 5 üzerinde ikililer dahil tüm Stem-Count veya Flow-Count Florosferleri çevreleyen şekilsiz bir H Bölgesi oluşturun. H bölgesi, Histogram 5'in sağ üst köşesine konumlandırılmalıdır.

NOT: H Bölgesinin ŞEKİLSİZ bir bölge olarak çizildiğinden emin olun.

8. Histogram 5 – Histogram 5'te doğrusal bir K Bölgesi (“listgate –” (liste geçidi adlı)) oluşturun. İki parametre histogramının ilk onlu günlüğünde K Bölgesi sınırlarını ayarlayın. Bu K Bölgesi, 75.000 ilgili CD45+ olayını analiz etmek için veri edinme sırasında çift negatif olayların ortadan kaldırılmasını sağlar.
9. Histogram 6 – D Bölgesini Histogram 4'ten F Bölgesi olarak Histogram 6'ya kopyalayın.
10. Histogram 7 – Histogram 7 üzerinde yalnızca Stem-Count Florosferleri veya Flow-Count Florosferleri singletlerini içeren doğrusal bir G Bölgesi oluşturun. G Bölgesi, CD34+ HPC mutlak sayılarının otomatik hesaplanmasına izin vermek üzere “CAL” olarak etiketlenebilir (daha fazla bilgi için cihaz kılavuzuna bakın).
11. Histogram 8 – Histogram 8'de canlı lökositleri içeren doğrusal J Bölgesi oluşturun (7-AAD Viyabilite Boyası negatif olayları).

Kapı Oluşturma

Kapıları aşağıdaki şekilde oluşturun:

1. Histogram 1 – Tüm canlı olayları görüntülemek için Histogram 1'e "J" atayın. 7-AAD kullanılmıyorsa Histogram 1'e "-H" bölgesini atayarak ikililer dahil tüm Stem-Count Florosferleri veya Flow-Count Florosferleri'nin hariç tutulduğu tüm olayları görüntüleyin.
2. Histogram 2 – Canlı (7-AAD kullanılmıyorsa toplam) CD34+ olaylarını görüntülemek için Histogram 2'ye "AJ" (7-AAD kullanılmıyorsa "A") atayın.
3. Histogram 3 – Tüm canlı (7-AAD kullanılmıyorsa toplam) CD45+/CD34+ olaylarını görüntülemek için Histogram 3'e "A", "B" ve "J" (7-AAD kullanılmıyorsa "A" ve "B") atayın.
4. Histogram 4 – Trombosit ve birikintileri dışlarken düşük yana yayılım sergileyen canlı (7-AAD kullanılmıyorsa toplam) CD45+/CD34+ kümelenmiş olaylarını görüntülemek için Histogram 4'e "A", "B", "C" ve "J" (7-AAD kullanılmıyorsa "A", "B" ve "C") atayın. ABCDJ Bölgesindeki olaylar gerçek canlı CD34+HPC'dir.
5. Histogram 5 – Tüm olayları göstermek üzere geçersizdir.
6. Histogram 6 – Ayrıştırıcıda görsel inceleme olarak canlı (7-AAD kullanılmıyorsa toplam) lenfositleri görüntülemek için Histogram 6'ya "EJ" (7-AAD kullanılmıyorsa "E") atayın.
7. Histogram 7 – Histogram 7'ye ikililer dahil tüm Stem-Count Florosferlerini veya Flow-Count Florosferlerini göstermek üzere "H" atayın.
8. Histogram 8 – Histogram 8'e CD45+ olaylarını göstermek üzere "A" atayın.

Akış Sitometresi Ayarı

1. Akış sitometrisinin üretici ve laboratuvar kılavuzuna göre FL1, FL2, FL3 ve FL4 dedektörlerinin ışık yayılımı ve floresans yoğunlukları için uygun biçimde ayarlanıp optimize edildiğini doğrulayın. Standart çalışma için renk dengelemesinin ayarlandığını doğrulayın. Daha fazla talimat için cihazın kılavuzuna bakın.
2. Test tüplerini 5 saniye boyunca vorteksleyin.
3. Akış sitometresi üzerinde veri edinme gerçekleştirin. En az 75.000 CD45+ olayı analiz edilmelidir.
4. Numune analizi için: 45/34/7-AAD #1 örnek tüpünü analiz ederek ayrıştırıcı ile bölgeleri ayarlayın. Protokolü kaydedin ve daha fazla ayarlama yapmaksızın 45/34/7-AAD #2 ve 45/CTRL/7-AAD tüplerini analiz edin.

Analiz Örneği

EK'te gösterilen histogramlar protokolde gösterildikleri gibi artan sayı sırasıyla görüntülenir.

Numuneler için CD34+ HPC hesaplaması

CD34+ HPC sayısı iki kopya örnek (yani 45/34/7-AAD #1 ve 45/34/7-AAD #2) için D bölgesi istatistiksel sonuçları ortalaması olarak hesaplanır.

CD45-FITC/IsoClonic Control-PE reaktifi ile elde edilen sonuçlar CD34+ HPC sonuçlarının %10'undan düşükse CD34+ HPC sonuçları geçerli kabul edilir.

1. Her numune için 45/34/7-AAD #1 ve 45/34/7-AAD #2 tüplerinden elde edilen sonuçların ortalamasını alın (yani D Bölgesi istatistikleri ortalaması çıktı sonuçları). CD34+ HPC sayısı kopya örneklerin ortalamasında %10 içinde olabilir. 45/CTRL/7-AAD kontrol tüpüyle elde edilen değer, sonuçların valide edilmesi için test tüplerinden elde edilen ortalama değerin %10'undan daha az olmalıdır

NOTLAR: Kopya CD34+ HPC için elde edilmiş mutlak sayım ortalaması kabul edilen aralığın dışındaysa (yani %10'u aşıyorsa), pipetlemenin özellikle Stem-Count Florosferleri veya Flow-Count Florosferleri için doğru biçimde yapılıp yapılmadığını belirleyin. Akış sitometresi raporlarını ve test tüplerinizdeki boyama ve parçalama işlemlerinin kalitesini görsel olarak kontrol edin. Bölge sınırlarının ayarlanma yöntemini doğrulayın.

45/CTRL/7-AAD ile elde edilen değer kabul edilen değerler aralığının dışındaysa (yani kopya için saptanmış mutlak sayım ortalamasının %10'unu aşıyorsa), pipetlemenin özellikle Stem-Count Florosferleri veya Flow-Count Florosferleri için doğru biçimde yapılıp yapılmadığını saptayın. Akış sitometresi raporlarını ve test tüplerinizdeki boyama ve parçalama işlemlerinin kalitesini görsel olarak kontrol edin. Bölge sınırlarının ayarlanma yöntemini doğrulayın.

Gerekirse veri edinme adımı ilk kopya tüp 45/34/7-AAD #1 ve #2 sonrasında ve 45/CTRL/7-AAD tüpü öncesinde BLANK bir tüp ekleyerek tekrarlayın. Gerekirse tüm preparatı, BLANK tüp ekleyerek yeni test tüpleriyle tekrarlayın. Hem yeni hem de önceki tüp serilerini edinin ve analiz edin. İki sonucu karşılaştırın. Uyuşmazlık varsa yerel Beckman Coulter Temsilcinizi arayın.

2. Örnek seyreltiliyse, yukarıda elde edilen sonuç uygun dilüsyon faktörü (Dil) ile ÇARPILMALIDIR. Elde edilen nihai sonuç mutlak CD34+ HPC sayımıdır (hücre/ μ L).

$$\text{CD34+ HPC Mutlak Sayım (hücre/}\mu\text{L)} = \text{CD34+ HPC Mutlak Sayım Çıktı Sonucu (hücre/}\mu\text{L)} \times \text{Dil}$$

3. Aferez ambalajlarında her ambalaj için toplam CD34+ HPC sayısı aşağıdaki formülle hesaplanabilir:

$$\text{Ambalaj başına CD34+ HPC Toplam Sayısı} = \text{CD34+ HPC Mutlak Sayımı (hücre/}\mu\text{L)} \times 10^6 \times \text{Ambalaj Miktarı (L)}$$

Burada:

4. CD45+ lökosit değeri hesaplama içinde CD34+ HPC yüzdesi için aşağıdaki formüle bakın:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{CD34+ HPC Mutlak Sayım (hücre/}\mu\text{L)} \times 100}{\text{CD45+ Lökosit Mutlak Sayımı (hücre/}\mu\text{L)}} \times 100$$

(yani D Bölgesi Çıktı Sonuçları) (yani A Bölgesi Çıktı Sonuçları)

KALİTE KONTROL

Akış sitometrisinin cihaz kılavuzunda sıralanan üretici tavsiyelerine göre uygun biçimde ayarlanmasını sağlayın. CD45-FITC / CD34-PE monoklonal antikor reaktifi ve CD45-FITC/Isoclonic Control-PE reaktifi ile boyanmış örneklerin analizi için ışık yayılımı ve floresans cihazının ayarlarını optimize etmek üzere hedef yoğunluklar saptanmıştır.

Florosein izotiosiyanat (FITC), fikoeritrin (PE) ve 7-Amino Aktinomisin D boyası (7-AAD) florokromları farklı dalga boylarında yayılır ancak elektronik kompanzasyon ile düzeltilmesi gereken spektral çakışmaları mevcuttur. Optimal kompanzasyon seviyeleri, CXP Yazılımı kullanılırken 7-AAD Viyabilite Boyası ve uygun kompanzasyon reaktifleri ile boyanmış Stem-Trol Control Cells eklenen tam kan örneğinin ikili parametre histogramında analiz edilmesiyle saptanabilir. Bu analizde herhangi bir florokrom içeren iki renkli dörtlükte boyama olmamasını sağlamak için ayarlamalar yapılır.

7-AAD Viyabilite Boyası (7-Amino Aktinomisin D) akış sitometrisi analizi ile canlı olmayan hücreleri tanımlayarak ilgili canlı hücrelerin sayımı sağlanır. Ölü hücreler (parlak olaylar) boyayı kaplar ve daha sonra canlı hücrelerden (negatif olaylar) kapılama yoluyla dışlanır (Histogram 8).

Örnekler analiz edilmeden önce antikor reaktivitesinin doğrulanması için test edilmiş kontrol (Stem-Trol Kontrol Hücreleri) boyanmalıdır.

PERFORMANS

Sunulan performans özellikleri System II Yazılımını içeren COULTER EPICS XL/XL-MCL akış sitometresiyle kullanılan Stem-Kit Reaktiflerine dayanmaktadır. CXP Yazılımını içeren FC 500 üzerindeki performans örnekleri için stemCXP System Guide'a (Sistem Kılavuzu) bakın.

Referans Aralıkları İçin Beklenen Değerler

Normal bir referans aralığı oluşturmak için erkek (n=58) ve kadın (n=59) popülasyonundan normal tam kan numuneleri (n = 117) toplanmıştır. Bu çalışma harici bir değerlendirme bölgesinde gerçekleştirilmiştir. Her numunenin kopya testleri Stem-Kit Reaktifleri prospektüsüne göre hazırlanmıştır. CD45+, CD34+ ve CD%34 değerlerini elde etmek için manuel kapılama ve analiz yürütülmüştür.

İstatistiksel analiz, toplanan verilerin Gaussian olmayan yolla dağıtımını önermektedir. Bu bulgulara dayanarak verilerin analizinde parametrik olmayan (sağlam) bir yaklaşım kullanılmıştır. CD45+, CD34+ ve CD%34 değerleri elde edilmiştir. Değerler aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi CD45+ ve CD34+ için mutlak sayım (hücre/μL) ve toplam lökosit sayımı yüzdesi (CD%34) cinsinden ifade edilmektedir.

Normal Tam Kan: Referans Aralıkları

Manuel Yöntem (Sağlam Analiz)	n	CD45+ (hücre / μL)				CD34+ (hücre / μL)				CD34+ (%)			
		Min	Max	Ortalama	SS	Min	Max	Ortalama	SS	Min	Max	Ortalama	SS
Manuel	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Bu değerlerin sadece temsili olması amaçlanmaktadır. Her laboratuvar normal donörlerden oluşan yerel popülasyonunda kendi beklenen değerlerini oluşturmalıdır.

Linearity

Kopya ölçümler 10 seri dilüsyonun her birinde 2 örnek türü için yapılmıştır: CD34+-ekli periferik tam kan ve taze mobilize periferik tam kan. CD34+ HPC konsantrasyonları için 0 ila 2.000 hücre/μL dinamik aralığı ve 0 ila 150 hücre/μL düşük uç hassasiyet aralığı elde edilmiştir. Örnekler Stem-Kit Reaktif prospektüsüne göre hazırlanmış ve COULTER EPICS XL/XL-MCL akış sitometresinde analiz edilmiştir. Değerler mutlak sayım olarak ifade edilmektedir (hücre/μL). Sonuçlar kopyanın daha az endojen CD34+ hücreleri ortalaması için beklenen/kazanılan mutlak sayımların doğrusal regresyon analizleri açısından analiz edilmiştir. Aşağıdaki tablolara bakın.

Toplam CD34+ HPC mutlak sayımları için grafiklerle beraber verilen regresyon çizgileri eğrileri, doğrusallığın matematiksel ölçümünü göstermektedir. Bu, analizlerin y-kesişimlerinde görüldüğü gibi minimum potansiyel test eğilimi ile desteklenmektedir. Beklenen mutlak sayımlar kazanılan mutlak sayımlarla yüksek korelasyon sergilemektedir.

CD34+ Eklenmiş Tam Kan Sonuçları

Grafik için bkz. Ek.

Periferik (Mobilize) Kan Sonuçları

Grafik için bkz. Ek.

Yöntemin Doğruluğu (Tablolar) (Beklenen ve Kazanılmış Sonuçlar)

Yöntem Doğruluğu, manuel ve otomatik kapılama ve analiz yöntemlerinin beklenen ve kazanılan sonuçları arasındaki uyum derecesi olarak tanımlanır. Taze normal periferik tam kana 1.875 hücre/ μ L seviyesine kadar CD34+ hücreleri eklenmiştir. Hücre sayımı Malassez slayt hemasitometresi ile doğrulanmış ve seri biçimde farklı konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Her dilüsyon seviyesinde otomatik ve manuel kapılama ve analiz kullanılarak kopya ölçüm ortalaması bakımından beklenen sonuçlar kazanılan sonuçlar ile karşılaştırılır. Kesmedeki eğim ve ordinat testleri otomatik kapılama ve analiz ile beklenen sonuçlar arasında veya manuel kapılama ve analiz ile beklenen sonuçlar arasında istatistiksel bir fark sergilemez.

Yöntemin Doğruluğu - CD34+ (%)

Grafik için bkz. Ek.

Yöntemin Doğruluğu - CD34+ Mutlak Sayım (hücre/ μ L)

Grafik için bkz. Ek.

Yöntemin Doğruluğu - Toplam Lökosit - CD45+ (hücre/ μ L)

Grafik için bkz. Ek.

Yöntemin Doğruluğu (Otomatik - Manuel Sonuçlar)

stemONE Sisteminin otomatik ve manuel yöntemleri arasındaki doğruluk derecesi, taze periferik tam kan ve taze veya çözündürülmüş aferez, kordon kanı ve kemik iliği numuneleri kullanılarak dört harici değerlendirme bölgesinde incelenmiştir. Güven aralıkları (CI) %95 sınırlarında hesaplanmıştır.

Taze periferik tam kan (üç bölgeden n = 59), taze aferez ürünleri (üç bölgeden n = 51), taze kordon kanı (iki bölgeden n = 29), taze kemik iliği (iki bölgeden n = 33), çözündürülmüş aferez ürünleri (bir bölgeden n = 23), çözündürülmüş kordon kanı (iki bölgeden n = 31) ve çözündürülmüş kemik iliği (bir bölgeden n = 20) numuneleri Stem-Kit Reaktifleri prospektüsüne göre hazırlanmış ve COULTER EPICS XL/XL-MCL akış sitometrelerinde analiz edilmiştir. CD45+, CD34+ ve CD%34 değerlerini elde etmek için otomatik ve manuel kapılama ve analiz yürütülmüştür.

Yöntemlerin Doğruluğu (Rakamlar)

Taze Periferik Tam Kan Numuneleri (n = 59)

Grafik için bkz. Ek.

Taze Aferez Numuneleri (n = 51)

Grafik için bkz. Ek.

Taze Kordon Kanı Numuneleri (n = 29)

Grafik için bkz. Ek.

Taze Kemik İliği Numuneleri (n = 33)

Grafik için bkz. Ek.

Çözündürülmüş Aferez Numuneleri (n = 23)

Grafik için bkz. Ek.

Çözündürülmüş Kordon Kanı Numuneleri (n = 31)

Grafik için bkz. Ek.

Çözdürülmüş Kemik İliği Numuneleri (n = 20)

Grafik için bkz. Ek.

Kesinlik

Laboratuvarlar Arası Kesinlik

Her biri farklı bir akış sitometrisi kullanan üç operatör aynı klinik tesiste çalışmalarını yürütmüştür. CD34+ dinamik aralığını (0-2.000 hücre/ μ L) ifade eden üç numune tanımlanmıştır:

Düşük aralık:	taze, mobilize periferik kan
Orta aralık:	aferez ürünü
Yüksek aralık:	aferez ürünü

Bu numuneler üç ikincil örneğe ayrılmıştır, üç operatörün her birine her seviyeden (düşük, orta, yüksek) bir ikincil örnek verilmiştir. Örnekler (n = 10) her ikincil örnekten Stem-Kit Reaktif prospektüsüne göre hazırlanmıştır. Her operatör CD45+, CD34+ ve CD%34 değerlerini elde etmek için otomatik ve manuel kapılama ve analiz kullanarak EPICS XL akış sitometrisi üzerinde analiz yürütmüştür. Değerler toplam lökosit sayımı yüzdesi (%) cinsinden ve mutlak sayım (hücre/ μ L) olarak ifade edilmektedir.

Aşağıdaki tablolarda seviyelere göre Laboratuvarlar Arası Kesinlik Çalışması sonuçları verilmektedir. CD45+ ve CD34+ mutlak sayımları ve CD34 yüzdeleri için elde edilen değerler, kopya ölçümlerin ortalamaları, standart sapmaları ve varyasyon katsayıları ile kanıtlandığı üzere çok az farklılık sergilemiştir.

Grafik için bkz. Ek.

Laboratuvar İçi Kesinlik

Testin dinamik aralığını kaplayan numuneler dört harici değerlendirme bölgesinden alınan taze periferik tam kan, taze kemik iliği ve taze ve çözündürülmüş aferez ve kordon kanı kullanılarak elde edilmiştir. CD45+, CD34+ ve CD%34 değerlerini elde etmek için her birinden on örnek Stem-Kit reaktifleri prospektüsüne göre hazırlanıp manuel kapılama ve analiz kullanılarak COULTER EPICS XL/XL-MCL akış sitometreleri üzerinde analiz edilmiştir.

Sonraki tablolarda verilen CD45+, CD34+ ve CD%34 değerleri, bu ölçümlerin ortalamaları, standart sapmaları ve varyasyon katsayıları ile kanıtlandığı üzere analiz yönteminin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. EK'te gösterilen veri tabloları testin Laboratuvarlar Arası Kesinliğini kanıtlamaktadır.

Grafik için bkz. Ek.

SINIRLAMALAR

Otomatik yöntem kullanılırken sınırlamalar için stemCXP Sistem Yazılımıyla verilen stemCXP System Guide'a (stemCXP Sistem Kılavuzu) bakın.

- Boyalı ve parçalanmış örnekler, "İşlenmiş Örnek stabilitesi" bölümündeki bilgilere göre buzda saklanıp akış sitometresinde analiz edilmelidir, aksi halde hatalı sonuçlar ortaya çıkabilir.
- Reaktifleri seyreltmeyin, kısımlara ayırmayın veya dondurmayın. Sadece ambalajlı olanları kullanın.
- Reaktifler sadece akış sitometrisinde kullanım içindir.
- Dondurulmuş numuneleri uygun biçimde çözündürerek optimal boyama sağlayın.
- Aşağıdaki koşullarda tüm kırmızı kan hücreleri parçalanmayabilir: çekirdekli kırmızı kan hücrelerinin, anormal protein konsantrasyonunun veya hemoglobinoatillerin varlığı. Bu, parçalanmamış kırmızı kan hücrelerinin lökosit olarak sayılması nedeniyle hatalı düşük CD%34 sonuçlarına yol açabilir. CD34+ ve CD45+ mutlak sayımları etkilenmemelidir.
- Bazı hastalar değişmiş veya az sayıdaki belirli hücresel popülasyonlara bağlı olarak özel sorunlar yaşayabilir.
- Kapılar yanlış biçimde ayarlanırsa akış sitometrisi ile elde edilen sonuçlar hatalı olabilir.
- Stem-Kit Reaktifleri HPC canlı hücrelerinin saptanması için 7-AAD Viyabilite Boyası kullanılacak şekilde tasarlanmıştır. Laboratuvarınız alternatif bir viyabilite saptama yöntemi kullanıyorsa, raporlanan sonuçların kalitesini sağlamak için genel iyi laboratuvar uygulamalarına ve kendi laboratuvarınızın kalite kontrol prosedürlerine uyun.

TİCARİ MARKALAR

Bu belgede belirtilen Beckman Coulter, stilize logo ve Beckman Coulter ürün ve hizmet markaları, Beckman Coulter, Inc. firmasının ABD'de ve diğer ülkelerdeki ticari veya tescilli ticari markalarıdır.

EK BİLGİLER

www.beckmancoulter.com

Sembol Anahtarı

Semboller Sözlüğü beckman.com/techdocs adresinde bulunabilir (belge numarası B60062)

Реагенты Stem-Kit

REF IM3630 50 тестов

Применяется для *In Vitro* диагностики.

НАЗНАЧЕНИЕ

В набор реагентов Stem-Kit входят реагент с мышинным моноклональным антителом, меченый двухцветным флуоресцентным красителем (FITC, PE), контрольный мышинный изоклон, меченый двухцветным флуоресцентным красителем (FITC, PE), реагент абсолютного количества, реагент жизнеспособности и реагент для лизирования. Набор предназначен «Для *in vitro* диагностики» для одновременной идентификации и подсчета процентного содержания и абсолютных количеств популяций клеток CD45+ и двойственно-положительных клеток CD45+ CD34+ в биологических образцах методом проточной цитометрии. В число биологических образцов входят образцы свежей нормальной или мобилизованной периферийной цельной крови, и образцы свежих либо оттаянных продуктов афереза, пуповинной крови или костного мозга. Измерения популяций клеток можно производить либо автоматизированным методом сортировки и анализа, либо вручную.

См. вкладыш к набору реагентов Stem-Kit, чтобы получить полные инструкции по ручному анализу. Если вы используете автоматический метод, ознакомьтесь со stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP) с набором программного обеспечения stemCXP 2.0 и stemCXP версии 2.0, WIN 7, в которых приведены исчерпывающие инструкции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Гемопозитические клетки-предшественники (HPC)

Реагенты Stem-Kit разработаны для идентификации человеческих гемопозитических клеток-предшественников (HPC), причем для этой процедуры установлены следующие критерии: «истинные клетки CD34+ (а) экспрессируют антиген CD34, (b) экспрессируют антиген CD45 с характеристиками окраски, соответствующими бластным клеткам (то есть клетки легко распознаются, но на более низких уровнях, чем лимфоциты и моноциты), и (с) выявляют характеристики рассеяния бластных клеток с малым боковым углом и с передним углом, значение которого находится в диапазоне от малого до среднего» (1). Краситель 7-AAD, разработанный для выявления жизнеспособности, позволяет исключать мертвые CD34+ HPC из числа подсчитанных CD34+ HPC (2).

CD34

Антиген CD34 представляет собой семейство дифференциально гликозилированных трансмембранных одноцепочечных гликопротеинов I типа. (3, 4, 5). Он экспрессируется практически всеми гемопозитическими клетками-предшественниками, включая мультипотентные стволовые клетки. Эпитопы CD34 разделены на три класса в зависимости от чувствительности к нейраминидазе и к гликопротеазе *Pasteurella haemolytica* (6). Моноклональному антителу (mAb) CD34, вошедшему в комплект реагентов Stem-Kit, присвоено обозначение 581. Он специфическим образом распознает эпитопы III класса молекул CD34 (7), что определяется схемой ферментативного расщепления (6, 8). Моноклональное антитело 581 было признано специфичным в отношении антигена CD34 во время 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), проходившем в 1993 г. в Boston, Massachusetts, USA (США) (7).

CD45

Антитело CD45 распознает членов семейства CD45 пан-клеточных лейкоцитарных антигенов, молекулярный вес которых составляет 180, 190, 210 и 220 кДа (9, 10, 11). Он также известен, как общий лейкоцитарный антиген (LCA). Антиген CD45 экспрессируется на гемопозитических клетках любого типа за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников (11, 12). В дифференцированных негемопозитических тканях (12, 13, 14, 15) он обнаружен не был. Моноклональное антитело CD45 mAb, входящее в комплект реагентов Stem-Kit, носит обозначение J33. Оно было присвоено антигену CD45 во время 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека) в Oxford, Англия, в 1986 году (16).

7-AAD

Краситель для определения жизнеспособности 7-амино-актиномицин D (7-AAD) является аналогом актиномицина D, содержащим замещенную аминогруппу в 7-й позиции хромофора. Краситель для определения жизнеспособности 7-AAD интеркалирует между цитозиновым и гуаниновым основаниями ДНК (15). Актиномицины являются биологически активными соединениями, содержащими хромофор 2-амино-4, 6 диметилфеноксазона-3 и два циклических пентапептида (17). Актиномицины образуют стабильные комплексы с двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), но ни с двухцепочечной рибонуклеиновой кислотой (РНК), ни с гибридами РНК-ДНК, ни с одноцепочечными РНК и ДНК они этих комплексов не образуют (15, 18).

Спектральные свойства красителя 7-AAD, разработанного для выявления жизнеспособности, делают эту молекулу особенно подходящей для анализа средствами проточной цитометрии (17). Максимальное значение абсорбции комплекса 7-AAD / ДНК достигается в зеленом регионе спектра, и таким образом, оно оказывается подходящим для цитометров, снабженным аргоновым лазером (длина волны возбуждения составляет 488 нм) (15). Ввиду

испускания красителем 7-AAD, предназначенным для определения жизнеспособности (от 635 до 675 нм), темно-красной флуоресценции, использовать эту пробу будет проще в сочетании с антителами, конъюгированными с флуоресцинизоцианатом (FITC) и с фикоэритрином (PE), потому что в отличие от пропидиума иодида (PI), комплекс 7-AAD / ДНК дает минимальное спектральное перекрытие с FITC и PE (17).

При анализе жизнеспособных клеток с помощью проточной цитометрии апоптотические, некротические клетки, а также поврежденные клетки являются источником интерференции. Нежизнеспособные клетки следует оценивать и выделять, прибегая к 7-AAD-позитивному окрашиванию, когда жизнеспособные клетки остаются неокрашенными (отрицательный признак) (19).

Системы проточных цитометров

В системах проточной цитометрии (FC 500) принципы проточной цитометрии применяются при анализе биологических образцов с тем, чтобы на основе используемых в ходе теста специфических моноклональных антител, поведение которых анализируется с помощью флуорохромов, идентифицировать различные клеточные популяции. Для анализа проб в ходе настоящего теста используются системы проточной цитометрии FC 500, снабженные программным обеспечением системы СХР.

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Настоящий тест зависит от способности моноклональных антител связывать поверхность клеток, экспрессирующих дискретные антигенные детерминанты. Реагент CD45-FITC / CD34-PE из набора реагентов Stem-Kit является комбинацией двух мышиных моноклональных антител; каждое из них конъюгировано со специфическим флуорохромом и является специфичным для своего антигена на клеточной поверхности. К специфическому окрашиванию клеточной поверхности добавляется инкубация дублирующей пробы биологического образца с помощью двухцветного реагента CD45-FITC / CD34-PE.

В порядке дополнительного теста та же проба окрашивается реагентом CD45-FITC / IsoClonic Control-PE для определения реакции неспецифического связывания с моноклональными антителами к антигену CD34-PE. Краситель жизнеспособности 7-AAD, который является красителем нуклеиновой кислоты и связывает доступные пары оснований (клеточные ДНК), используется для того, чтобы отличать жизнеспособные клетки от нежизнеспособных. Эритроциты в каждой пробе подвергаются лизису с помощью лизирующего раствора NH₄Cl, приготовленного в концентрации 1X. Добавляются флуоросферы Stem-Count или Flow-Count (реагенты для определения абсолютного количества), а оставшиеся клетки анализируются в проточном цитометре. Контроль процесса и контроль качества в ходе проведения испытания обеспечиваются специальными реагентами для контроля за инструментом и для контроля за качеством проб: флуоросферами Flow-Check, флуоросферами Flow-Set или подходящими компенсационными реагентами, а также Stem-Trol Control Cells.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Как показывает история, первые научные исследования, посвященные гемопоэтическим клеткам-предшественникам (НРС), основывались на подсчете ядросодержащих клеток с целью количественного определения. Последующие исследования, включавшие в себя анализ колониеобразующих единиц (КОЕ), давали грубое приближение популяций клеток-предшественников. На смену анализу КОЕ, сопряженному с большими временными затратами, пришло открытие молекул поверхности клеток CD34. Как выяснилось, CD34 присутствует на поверхности ранних гемопоэтических клеток, а также на поверхности колониеобразующих клеток в костном мозге и в периферической крови (20). Затем были выведены моноклональные антитела, направленные против молекул CD34; они нашли себе применение в проточной цитометрии. Определение CD34 средствами проточной цитометрии в настоящее время получило широкое признание в качестве метода количественного анализа гемопоэтических клеток-предшественников и стволовых клеток.

У обычного индивида от 1 до 3% клеток костного мозга, экспрессирующих антиген CD34, в состоянии восстановить долгосрочный мультилинейный гемопоэз (3, 20). В периферической крови обычного индивида антиген CD34 выделяется менее чем 0,1% циркулирующих клеток (1, 21). Использование реагентов Stem-Kit обеспечивает простой, быстрый и высокочувствительный метод цитометрии для подсчета гемопоэтических клеток-предшественников и стволовых клеток в периферической крови, продуктах лейкофереза, костном мозге и пуповинной крови.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Реагенты Stem-Kit содержат следующее:

- Реагент CD45-FITC / CD34-PE (45/34) — 1 флакон.
 - Реагент CD45-FITC / IsoClonic Control-PE (45/CTRL) — 1 флакон.
 - Флуоросферы Stem-Count — 1 флакон.
 - Краситель жизнеспособности 7-AAD — 1 флакон.
 - Лизирующий раствор 10X NH₄Cl Lysing Solution — 2 флакона.
1. Эти реагенты следует использовать как единый комплект, именно так, как они выпускаются.

При использовании специфических концентраций, установленных в целях исследования, для определения абсолютных количеств можно применять флуоросферы Flow-Count, эквивалентные флуоросферам Stem-Count.

2. CD45-FITC / CD34-PE — это готовый к употреблению двухцветный реагент, поставляемый в натрий-фосфатном буферном растворе (PBS) объемом 2,2 мл с альбумином бычьей сыворотки (BSA) содержанием 2 мг/мл и 0,1%-ным азидом натрия в качестве консерванта.
3. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE — это готовый к употреблению двухцветный реагент, поставляемый в натрий-фосфатном буферном растворе объемом 1,2 мл с альбумином бычьей сыворотки содержанием 2 мг/мл и 0,1%-ным азидом натрия в качестве консерванта. Реагент CD45-FITC / IsoClonic Control-PE представляет собой смесь неконъюгированных и конъюгированных фикоэритрином (идентичных CD34) моноклональных антител 581. Это смесь является подходящим средством изоморфологического контроля, позволяющим проверить наличие неспецифического связывания CD34-PE mAb в каждой пробе.

ЗАМЕЧАНИЕ: Реагенты CD45-FITC / CD34-PE и CD45-FITC / IsoClonic Control-PE разделять нельзя. При проведении тестов и контрольных измерений необходимо следить за тем, чтобы у обоих реагентов на этикетке флакона был один и тот же номер серии.

Сводка характеристик антител

Специфичность		CD45	CD34
Клон		J33	581
Гибридома		NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Иммуноген		Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Иммуноглобулин		Иммуноглобулин IgG1, легкие цепи к	Иммуноглобулин IgG1, легкие цепи к
Вид		Мышь	Мышь
Флуорохром		Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	R-фикоэритрин (PE)
Молярное отношение		5–8 молей FITC (флуоресцинизоотиоцианата) на моль иммуноглобулина	0,5–1,5 моля PE (фикоэритрина) на моль Ig (иммуноглобулина)
λ возбуждения		488 нм (сине-зеленый)	488 нм (сине-зеленый)
Испускание флуоресценции (преимущественно зеленый цвет)		От 504 до 541 нм	От 568 до 590 нм (преимущественно оранжевый цвет)

4. Флуоросферы Stem-Count и Flow-Count состоят из полистирольных флуоресцирующих микросфер диаметром 10 мкм (номинальный диаметр), погруженных в 20 мл водной суспензионной среды, содержащей сурфактант и 1% формальдегида. Каждая калибровочная частица содержит краситель с диапазоном флуоресценции от 525 нм до 700 нм при возбуждении волной на 488 нм. Оцениваемая концентрация флуоросфер Stem-Count или флуоросфер Flow-Count (число флуоросфер в 1 мкл) выводится по результатам многократных параллельных испытаний в анализаторе размеров частиц COULTER. Значение для каждой серии указано на этикетке флакона.
5. Краситель жизнеспособности 7-AAD выпускается в 99-процентном натрий-фосфатном буферном растворе (PBS: 0,01 М фосфат натрия, 0,145 М хлорид натрия, pH 7,2) с добавлением 1%-ного диметилсульфоксида (DMSO).
6. Лизирующий раствор NH₄Cl Lysing Solution выпускается во флаконах вместимостью 20 мл в десятикратной концентрации. Он содержит смесь хлорида аммония (NH₄Cl), бикарбоната калия (KHCO₂) и динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Препараты моноклональных антител содержат 0,1%-ный раствор азид натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. При сливании отходов в канализационную сеть следует открыть кран с водопроводной водой и дать протечь большому количеству воды во избежание взрывоопасных скоплений на трубах.
2. При работе с образцами и пробами, а также любыми контактирующими с ними материалами, следует выполнять правила и соблюдать меры предосторожности, установленные для потенциально инфицированных материалов.
3. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания проб или реагентов на кожу и слизистые оболочки.
4. Не используйте реагенты по истечении срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. Флуоросферы Stem-Count и Flow-Count содержат 1% формальдегида. Избегайте попадания формальдегида на кожу и в глаза, так как он может стать причиной необратимых повреждений этих тканей. Не вдыхайте пары. Используйте подходящие средства защиты, такие как перчатки и защита глаз.
6. Реагенты Stem-Kit нельзя подвергать воздействию яркого света или высоких температур ни во время хранения, ни при использовании.

7. Чтобы избежать получения ошибочных результатов измерения, не допускайте испарения и утечки флуоросфер Stem-Count и Flow-Count. После использования плотно закрывайте флаконы колпачками и храните их в вертикальном положении.
8. Перед использованием убедитесь, что калибровочные частицы полностью возвращены в состояние суспензии. Избегайте избыточного перемешивания, чтобы свести к минимуму образование пузырьков воздуха. Во избежание получения ошибочных результатов не пипетируйте пузырьки воздуха.
9. Для дозирования проб, флуоросфер Stem-Count или Flow-Count используйте калиброванные пипетки (предпочтение следует отдавать пипеткам прямого вытеснения или капиллярам), это позволит избежать получения ошибочных результатов.
10. Во избежание получения ошибочных результатов и с целью правильного и точного отбора проб и флуоросфер Stem-Trol или флуоросфер Flow-Count, используйте техники пипетирования, рекомендованные производителем пипетки.
11. Окрашенные и лизированные пробы требуется хранить на льду и анализировать на проточном цитометре в соответствии с информацией в разделе «Стабильность обработанной пробы», в противном случае возможно получение ошибочных результатов.
12. Убедитесь в том, что произведен подсчет по крайней мере 1 000 флуоросфер Stem-Count или флуоросфер Flow-Count, в противном случае автоматической конверсии результатов в подсчет абсолютного количества не произойдет.
13. Для каждой партии флуоросфер Stem-Count или Flow-Count характерна специфическая концентрация флуоросфер. Убедитесь, что используется правильная аналитическая концентрация при определении результатов определения абсолютного количества клеток-мишеней.
14. Не следует использовать методы подготовки, требующие шага промывки, в связи с неизвестной потерей клеток.
15. Если время инкубации или смешивания или соответствующие температуры будут разниться с теми, которые указаны в инструкции, результаты могут оказаться неправильными.
16. Краситель жизнеспособности 7-AAD содержит 0,005% 7-AAD. Вещество 7-AAD в неразбавленном виде является потенциальным канцерогеном. Хотя это соединение и используется в сильно разведенном виде, мы рекомендуем избегать контакта с кожей и с глазами, использовать защитную одежду и перчатки и соответствующие средства защиты глаз и лица.
17. Краситель жизнеспособности 7-AAD содержит 1% диметилсульфоксида (DMSO). В чистом виде DMSO вызывает раздражение. Хотя это соединение и используется в разведенном виде, мы рекомендуем избегать контакта с кожей и с глазами, использовать защитную одежду и перчатки и соответствующие средства защиты глаз и лица.
18. Будучи хромофором, 7-AAD чувствителен к свету. Хранить краситель жизнеспособности 7-AAD нужно в картонной упаковке набора, что позволит избежать длительного воздействия света во время хранения.
19. Во время инкубации сведите к минимуму воздействие света на смешанные пробы.
20. При обращении с реагентами соблюдайте общие правила работы в лаборатории.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Флуоросферы Stem-Count

ОПАСНО!



H316

Вызывает незначительное раздражение кожи.

H317

Может вызывать аллергическую кожную реакцию.

H350

Может вызвать рак.

P201

Перед использованием получить специальные инструкции.

P280

Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.

P308+P313

ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью.

	P333+P313	При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
	P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
		Формальдегид 0,5 - 1,0% реакционная смесь из 5-хлоро-2-метил- 4-изотиазолин -3-он [ЕС № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин -3-он [ЕС № 220-239-6](3:1) < 0,05%
Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	ОСТОРОЖНО!	
	H316	Вызывает незначительное раздражение кожи.
	P332+P313	При раздражении кожи: обратиться к врачу. Диметил сульфоксид 0,5 - 2%

 Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент сохраняет свои свойства вплоть до истечения срока годности, указанного на флаконе, если его хранить при температуре 2–8°C в темном месте. Не используйте после истечения срока годности. Не замораживайте. Реагенты Stem-Kit сохраняют свои свойства в течение 30 дней после вскрытия флаконов с флуоросферами Stem-Count или Flow-Count. Вскрытые флаконы следует закрыть колпачком сразу же после использования и поместить на хранение в темное место с температурой 2–8°C. Флуоросферы Stem-Count или Flow-Count НЕЛЬЗЯ аликвотировать в посторонние флаконы; они должны храниться только в своих оригинальных флаконах.

ВАЖНО: В случае утечки флуоросфер Stem-Count или Flow-Count возникает риск получения ошибочных результатов. После вскрытия флуоросферы Stem-Count или Flow-Count необходимо хранить в вертикальном положении во избежание возможности утечек. Не следует использовать реагенты, если наблюдаются признаки утечки.

Признаки порчи

К числу признаков порчи может быть отнесено следующее:

Реагенты Stem-Kit, за исключением флуоросфер Stem-Count

- Внешние изменения, см. ниже описание нормального внешнего вида для каждого вещества

Реагент	Нормальный внешний вид
CD45-FITC / CD34-PE	Прозрачная, слегка розовая жидкость
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Прозрачная или розоватая жидкость
Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	Прозрачная жидкость, от розоватого до красноватого цвета
Лизирующий раствор NH ₄ CL Lysing Solution	Прозрачная бесцветная жидкость

Stem-Count Fluorospheres

- Обнаруживаемые во время сбора данных признаки наличия второй флуоресцирующей популяции, которая составляет более 20% от общей популяции флуоросфер.
- При подсчете количеств и проб наблюдаются большие вариации значений.

ВАЖНО: В случае появления признаков порчи реагентами пользоваться нельзя, поскольку возможны ошибки в результатах. При обнаружении признаков порчи обратитесь в местное представительство компании Beckman Coulter.

Подготовка реагента

- Двухцветные реагенты CD45-FITC / CD34-PE и CD45-FITC / IsoClonic Control-PE следует использовать непосредственно из флакона в неразведенном виде.

- Флуоросферы Stem-Count и Flow-Count используются непосредственно из флаконов, без разведения. При первом вскрытии с верха флакона следует удалить весь алюминий термосвариваемого покрытия. Субстанции необходимо как следует перемешать. Впервые приступая к работе с флуоросферами Stem-Count или Flow-Count в начале дня, перемешайте их на вортексе в течение 3–5 секунд.

Перед пипетированием из флакона осторожно встряхните жидкость, перевернув флакон 3–5 раз.

После перемешивания на вортексе в начале дня восстановите значения температуры флакона, соответствующие 2–8°C; эта температура должна поддерживаться в течение всего времени, пока продукт не будет использован.

Во избежание испарения и утечек плотно закрывайте флакон колпачком после использования.

- Краситель 7-AAD, разработанный для определения жизнеспособности, используется прямо из флакона без разведения.
- Лизирующий раствор 1X NH_4Cl Lysing Solution необходимо готовить ежедневно: добавьте девять частей деионизированной воды к одной части лизирующего раствора NH_4Cl Lysing Solution, имеющего 10-кратную концентрацию. Не охлаждайте в холодильнике. В конце дня неиспользованный лизирующий раствор 1X NH_4Cl Lysing Solution утилизируют.

Прежде чем использовать какой-либо реагент, разогрейте его до комнатной температуры (18–25°C).

РАБОТА С ОБРАЗЦАМИ

Требования к образцам

Сводка по подготовке образцов:

Тип образца	Метод селекции	Температура хранения	Возраст образца
Аферез	Алгоритм	2–8°C	24 часа
	Вручную	2–8°C	24 часа
Костный мозг	Алгоритм	2–8°C	24 часа
	Вручную	2–8°C	24 часа
Пуповинная кровь	Алгоритм	18–25°C	24 часа
	Вручную	18–25°C	24 часа
Нормальная цельная кровь	Алгоритм	18–25°C	20 часов
	Вручную	18–25°C	20 часов
Мобилизованная цельная кровь	Алгоритм	18–25°C	20 часов
	Вручную	18–25°C	20 часов

- В число биологических образцов входят образцы свежей нормальной или мобилизованной периферийной цельной крови, и образцы свежих либо оттаянных продуктов афереза, пуповинной крови или костного мозга.
- Гемопозитические клетки-предшественники (HPC), подвергнутые манипуляциям или очищению, можно анализировать только в режиме ручной сортировки.
- Для сбора продуктов афереза, образцов периферической крови, образцов пуповинной крови или образцов костного мозга используйте стерильную вакуумную пробирку с антикоагулянтом для сбора крови (ACD формула A, K3 ЭДТА); эта мера обеспечит асептический режим.
- Образцы цельной крови и мобилизованной цельной крови, собранные в пробирки с антикоагулянтом, можно хранить в течение времени до 20 часов при комнатной температуре (18–25°C) до окрашивания.
- Образцы пуповинной крови, собранные в пробирки с антикоагулянтом, можно хранить в течение времени до 24 часов при комнатной температуре (18–25°C) до окрашивания.
- Собранные продукты афереза и образцы костного мозга можно хранить в течение времени до 24 часов при температуре 2–8°C до окрашивания.
- Прежде чем подготавливать пробу, убедитесь в том, что концентрация лейкоцитов (WBC) не превышает 30×10^9 лейкоцитов на литр. В случае необходимости разведите пробу с помощью HBSS (сбалансированный солевой раствор Хенкса) или аналогичного средства, для того, чтобы достичь концентрации 15×10^9 WBC на литр. Запишите коэффициент разведения для окончательного расчета абсолютного количества HPC.
- Низкие концентрации белка могут приводить к комкованию флуоросфер Stem-Count или флуоросфер Flow-Count, результатом чего могут оказаться искусственно завышенные абсолютные количества клеток. Образцы с низким содержанием белка следует разводить буферным раствором, содержащим белок.
- Все образцы следует обрабатывать реагентами Stem-Kit, включая краситель жизнеспособности 7-AAD.

Процедура пробоподготовки

Выполните испытания дважды, следуя инструкциям «The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry» (Директивы ISHAGE по определению клеток CD34+ с помощью проточной цитометрии) (1).

ЗАМЕЧАНИЕ: Для работы с контрольными клетками Stem-Trol в том случае, если выбран метод вручную, воспользуйтесь исчерпывающими инструкциями, приведенными на вкладыше в упаковке к набору контрольных клеток Stem-Trol. Если вы используете автоматический метод, ознакомьтесь со stemONE System Guide (Руководство по системе stemONE) с программным обеспечением системы stemONE или stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP) с программным обеспечением системы stemCXP, в которых приведены исчерпывающие инструкции.

1. Для каждой пробы образца нанесите на пробирки следующие обозначения:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Пипетируйте 20 мкл реагента CD45-FITC / CD34-PE в пробирки: 45/34/7-AAD #1 и 45/34/7-AAD #2.
3. Пипетируйте 20 мкл реагента CD45-FITC / IsoClonic Control-PE в пробирку: 45/CTRL/7-AAD.
4. С помощью пипетки добавьте во все пробирки по 20 мкл красителя жизнеспособности 7-AAD.

ВАЖНО: Риск неполного лизиса, если образец крови остается в верхней части или на боковой стороне тестовой пробирки. Выполняйте пипетирование с осторожностью, чтобы избежать попадания крови на верхнюю или боковую часть тестовой пробирки. Очистите пробирку ватным шариком, если требуется, чтобы удалить все следы образца крови с верхней или боковой части тестовой пробирки.

5. Используя пипетку прямого вытеснения или репипетку, пипетируйте 100 мкл пробы пациента в пробирку.
6. ж) Немедленно перемешивают пробирку на вортексе в течение 5 с.
7. Все пробирки инкубируйте при комнатной температуре (18–25°C) в течение 20 минут, в защищенном от света месте.
8. После инкубации добавьте 2 мл приготовленного лизирующего раствора 1X NH₄Cl Lysing Solution в каждую пробирку и незамедлительно обработайте на вортексе в течение 5 секунд.

ЗАМЕЧАНИЕ: Подробные сведения по приготовлению лизирующего раствора Lysing Solution приведены выше в разделе 7.2 «ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ».

ВАЖНО: Риск ошибочных результатов в случае пипетирования пузырьков воздуха. Излишнее перемешивание флуоросфер Stem-Count или Flow-Count может привести к созданию пузырьков воздуха. Не допускайте чрезмерного перемешивания флуоросфер Stem-Count или Flow-Count и не пипетируйте пузырьки воздуха в пробирки с пробой.

9. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 мин, в защищенном от света месте.
10. Осторожно перемешайте флуоросферы Stem-Count или Flow-Count, переворачивая флакон 3–5 раз перед использованием.
11. Перед сбором данных и сразу же после шага 9, используя пипетку прямого вытеснения или репипетку, пипетируйте по 100 мкл флуоросфер Stem-Count или Flow-Count в каждую из трех пробирок.
12. Перемешайте на вортексе каждую пробирку в течение 5 секунд.

ЗАМЕЧАНИЕ: Подробные сведения по приготовлению лизирующего раствора Lysing Solution приведены выше в разделе 7.2 «ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ».

Краткая инструкция по окрашиванию образцов

Реагенты и пробы	45/34/7-AAD #1	Наименование тестовой пробирки 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 мкл	20 мкл	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 мкл

Реагенты и пробы	45/34/7-AAD #1	Наименование тестовой пробирки 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	20 мкл	20 мкл	20 мкл
Образец	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Обработайте на вортексе — инкубируйте при комнатной температуре в течение 20 минут. Хранить в темном месте.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 мл	2 мл	2 мл
Обработайте на вортексе — инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 минут. Хранить в темном месте.			
Stem-Count Fluorospheres	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Вихревой смеситель			
Для собранных продуктов афереза, проб пуповинной крови или проб костного мозга не ожидайте более 60 минут при хранении проб на льду до сбора данных.			
Для проб цельной крови и мобилизированной цельной крови не ожидайте более 45 минут при хранении проб на льду до сбора данных.			
Оттаянную пробу следует немедленно анализировать.			
Храните в защищенном от света месте			

Стабильность обработанной пробы:

- Для собранных продуктов афереза, проб пуповинной крови или проб костного мозга после добавления флуоросфер Stem-Count или Flow-Count не ожидайте более 60 минут при хранении их на льду до сбора данных.
- Для проб цельной крови и мобилизированной цельной крови после добавления флуоросфер Stem-Count или Flow-Count не ожидайте более 45 минут при хранении проб на льду до сбора данных.
- Для замороженной пробы сбор данных следует выполнять незамедлительно после добавления флуоросфер Stem-Count или Flow-Count.
- Обработанные пробы следует хранить на льду с защитой от света и ограничивать воздействие комнатной температуры насколько возможно во время сбора данных.

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азиды натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH): Explosive Azide Hazard (Взрывоопасные азиды) (16.8.76).

Чтобы избежать накопления азидных соединений, промывайте сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азиды натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР:

1. Деионизированная вода.
2. Сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS) или его эквивалент
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Альтернатива Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF. 7547053)
9. Ледяная ванна
10. Пластиковые тестовые пробирки (12 x 75 мм)
11. Калиброванная репипет-пипетка (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками или калиброванная пипетка прямого вытеснения (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками
12. Калиброванные стандартные пипетки (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками.

13. Мешалка типа Вортекс (вихревой смеситель).
14. Таймер.
15. Проточный цитометр.
16. Набор программного обеспечения stemCXP 2.0, stemCXP версия 2.0, WIN 7, ТОЛЬКО для автоматического анализа проб на системе проточного цитометра FC 500, оснащенной программным обеспечением CXP (версия 2.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Настройки протокола анализа

Проточный цитометр должен быть оборудован средствами детекции прямого светорассеяния, бокового светорассеяния и четырех каналов флуоресценции. Для канала FL3 (для мониторинга флуоросфер Stem-Count или Flow-Count) используйте полосовой фильтр диапазонов 620 нм. Для канала FL4 (для мониторинга красителя жизнеспособности 7-AAD) используйте длинноволновой фильтр 675 нм.

Убедитесь в том, что проточный цитометр корректно отрегулирован, а измерение интенсивности флуоресценции стандартизировано.

9.2.3 Убедитесь в корректности настроек компенсации флуоресценции.

ЗАМЕЧАНИЕ: При анализе образцов все положения областей до момента завершения сбора материала пробирки 45/34/7-AAD #1 определяются приблизительно. Области оптимизируются согласно следующему протоколу и затем, при работе со второй и третьей пробиркой серии, никаких корректировок не допускается.

Для анализа образца необходимо следовать серии из 8 гистограмм и схеме сортировки (см. ниже). Этой же серии из 8 гистограмм и этой же схеме сортировки нужно следовать при использовании контрольных клеток CD34+. Области A, B, C и D (определения областей см. под заголовком «Создание областей») должны быть откорректированы так, чтобы они включали кластер характеристик контрольных клеток CD34+.

Построение гистограмм

Создайте гистограммы следующим образом:

1. Создайте гистограмму 1 как FL1 CD45-FITC относительно бокового рассеяния.
2. Создайте гистограмму 2 как FL2 CD34-PE относительно бокового рассеяния.
3. Создайте гистограмму 3 как FL1 CD45-FITC относительно бокового рассеяния.
4. Создайте гистограмму 4 как прямое рассеяние относительно бокового рассеяния.
5. Создайте гистограмму 5 как FL1 CD45-FITC относительно FL2 CD34-PE.
6. Создайте гистограмму 6 как прямое рассеяние относительно бокового рассеяния.
7. Создайте гистограмму 7 как время относительно флуоросфер FL3 Stem-Count или Flow-Count.
8. Создайте гистограмму 8 как краситель жизнеспособности FL4 7-AAD относительно бокового рассеяния.

Гистограммы 1–4 предназначены для описания CD34+ HPC, этот процесс можно отложить до этапа анализа. Эти первые четыре гистограммы настраиваются согласно ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (Руководство ISHAGE по определению клеток CD34+ методом проточной цитометрии) (1,2). Гистограммы 5–7 предназначены для мониторинга параметров, которые имеют значение на этапе сбора. Сюда входит дискриминатор прямого светорассеяния, количество событий CD45+ для сбора и правильное накопление синглетов флуоросфер.

Гистограмма 8 предназначена для дифференциации жизнеспособных и нежизнеспособных событий и проведения анализа жизнеспособных событий.

Создание регионов

Создайте следующие регионы:

1. Гистограмма 1 — создайте на гистограмме 1 прямолинейный регион A, включающий все лейкоциты CD45+ и исключающий тромбоциты, остатки эритроцитов и какие-либо скопления.
2. Гистограмма 1 — создайте на гистограмме 1 аморфную область E, которая будет включать лимфоциты (яркие CD45, низкое боковое светорассеяние).
3. Гистограмма 2 — создайте прямолинейный регион B на гистограмме 2, включающий все события CD34+. Установите на гистограмме 2 предел подсчета, равный 75 000 событий (события CD45+).

4. Гистограмма 3 — создайте аморфный регион С на гистограмме 3, включающий все объединенные события CD45dim.
5. Гистограмма 4 — создайте аморфный регион D на гистограмме 4, включающий все объединенные события со средним боковым рассеянием и средним или высоким прямым рассеянием.
6. Гистограмма 5 — создайте квадрант-регион I на гистограмме 5 для проверки нижнего предела экспрессии CD45 на событиях CD34⁺.
7. Гистограмма 5 — создайте аморфный регион H на гистограмме 5, чтобы окружить все флуоросферы Stem-Count или Flow-Count, включая дублиеты. Регион H должен быть расположен в верхнем правом углу гистограммы 5.

ЗАМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что регион H обозначен как регион AMORPHOUS (Аморфный).

8. Гистограмма 5 — создайте на гистограмме 5 прямолинейную область K (назовите ее «listgate – ») Установите границы области K на первой декаде логарифмической шкалы гистограммы двух параметров. Эта область K позволяет исключать дублирование отрицательных событий во время сбора, что позволит проанализировать 75 000 релевантных событий CD45⁺.
9. Гистограмма 6 — копируйте регион D с гистограммы 4 как регион F на гистограмме 6.
10. Гистограмма 7 — создайте прямолинейную область G на гистограмме 7, включающую только синглеты флуоросфер Stem-Count или Flow-Count. Область G можно отметить как «CAL» (Калибровка), чтобы обеспечить автоматический подсчет абсолютного количества гемопоэтических клеток-предшественников CD34⁺ HPC (дополнительные сведения приведены в руководстве по инструменту).
11. Гистограмма 8 — на гистограмме 8 создайте прямолинейную область, которая бы включала жизнеспособные лейкоциты (отрицательные события красителя жизнеспособности 7-AAD).

Создание гейтов

Создайте области селекции следующим образом:

1. Гистограмма 1 — выполните назначение «J» гистограмме 1 для отображения всех жизнеспособных событий. Если 7-AAD не используется, назначьте гистограмме 1 область «-H» для отображения всех событий, за исключением всех флуоросфер Stem-Count или Flow-Count, в том числе дублиетов.
2. Гистограмма 2 — поставьте гистограмме 2 в соответствие регион «AJ» (регион «A» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить все жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) события CD34⁺.
3. Гистограмма 3 — поставьте гистограмме 3 в соответствие регионы «A», «B» и «J» (регионы «A» и «B» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить все жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) события CD45⁺ / CD34⁺.
4. Гистограмма 4 — поставьте гистограмме 4 в соответствие области «A», «B», «C» и «J» (области «A», «B» и «C» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить все образующие кластеры жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) события CD45⁺ / CD34⁺ со слабым боковым светорассеянием, исключая при этом тромбоциты и посторонние частицы. События из региона ABCDJ являются действительными жизнеспособными гемопоэтическими клетками-предшественниками (HPC) CD34⁺.
5. Гистограмма 5 — без селектора для отображения всех событий.
6. Гистограмма 6 — поставьте гистограмме 6 в соответствие область «EJ» (область «E» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить с помощью дискриминатора все жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) лимфоциты в порядке визуальной проверки.
7. Гистограмма 7 — выполните назначение «H» гистограмме 7, чтобы отобразить все флуоросферы Stem-Count или Flow-Count, включая дублиеты.
8. Гистограмма 8 — выполните назначение «A» гистограмме 8 для отображения событий CD45⁺.

Настройки проточной цитометрии

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно настроен и оптимизирован для светорассеяния, а интенсивность флуоресценции детекторов FL1, FL2, FL3 и FL4 соответствует директивам производителя и лаборатории. Убедитесь, что настроена цветовая компенсация для стандартной работы. Дополнительные инструкции см. в руководстве по инструменту.
2. Обработайте тестовые пробирки на вортексе в течение 5 секунд.
3. Выполните сбор данных на проточном цитометре. Следует проанализировать не менее 75 000 событий CD45⁺.
4. Для анализа образцов: отрегулируйте дискриминатор и области, проанализировав содержимое пробирки с пробой 45/34/7-AAD #1. Сохраните протокол, и анализ пробирок 45/34/7-AAD #2 и 45/CTRL/7-AAD выполняйте уже без дальнейших корректировок.

Пример анализа

Гистограммы, содержащиеся в ПРИЛОЖЕНИИ, отображаются в порядке возрастания номеров, как показано в протоколе.

Расчет CD34+ НРС для образца

Число CD34+ НРС получают как среднюю величину статистических результатов области D для двух параллельных проб (то есть как 45/34/7-AAD #1 и 45/34/7-AAD #2).

Результаты CD34+ НРС считаются действительными в том случае, если количество результатов, полученных с помощью реагента CD45-FITC / IsoClonic Control-PE, составляет менее 10% от результатов CD34+ НРС.

1. Рассчитайте среднее значение для результатов, полученных из пробирок 45/34/7-AAD #1 и 45/34/7-AAD #2, по каждому образцу (то есть, выполните усреднение распечатанных статистических результатов по области D). Число CD34+ НРС не должно превышать 10% от средней величины двух параллельных проб. Результаты считаются действительными, если значение, полученное по контрольной пробирке 45/CTRL/7-AAD, составляет менее 10% от среднего значения по исследуемым пробиркам

ПРИМЕЧАНИЯ: Если среднее значение абсолютного количества CD34+ НРС, полученное по результатам параллельных испытаний, оказалось за пределами диапазона нормы (то есть превысило 10%), проверьте, правильно ли было произведено пипетирование; в особенности это касается флуоросфер Stem-Count и Flow-Count. Просмотрите отчеты проточной цитометрии и проверьте качество окрашивания и процессы лизирования в тестовых пробирках. Проверьте способ установки границ региона.

Если значение, полученное при использовании 45/CTRL/7-AAD, оказывается за пределами допустимых значений (т. е. превышает 10% от средней величины абсолютного количества, полученной в двух параллельных испытаниях), проверьте, правильно ли было произведено пипетирование; в особенности это касается флуоросфер Stem-Count или Flow-Count. Просмотрите отчеты проточной цитометрии и проверьте качество окрашивания и процессы лизирования в тестовых пробирках. Проверьте способ установки границ региона.

В случае необходимости повторите этап сбора данных, добавив пробирку BLANK (бланк) после первой дублирующей пробирки 45/34/7-AAD #1 и #2 и перед пробиркой 45/CTRL/7-AAD. В случае необходимости повторите цикл подготовки пробы с новыми тестовыми пробирками, добавив к ним пробирку BLANK (бланк). Выполните сбор и проанализируйте как новую, так и предыдущую серию пробирок. Сравните два результата. Если отсутствует соответствие, обратитесь в местное представительство компании Beckman Coulter.

2. Если проба была разведена, полученный результат ДОЛЖЕН быть умножен на коэффициент разведения (Dil). Окончательным полученным результатом будет абсолютное количество CD34+ НРС (клеток/мкл).

Абсолютное количество CD34+ НРС (клеток/мкл) = абсолютное количество CD34+ НРС согласно результатам распечатки (клеток/мкл) x коэффициент разведения
--

3. При анализе пакета продуктов афереза общее число CD34+ НРС пакета может быть рассчитано по следующей формуле:

Общее число CD34+ НРС (гемопозитических клеток-предшественников) в пакете = Абсолютное количество CD34+ НРС (клеток/мкл) x 10 ⁶ x объем пакета (л)

Где:

4. Для определения процентного содержания CD34+ НРС (гемопозитических клеток-предшественников CD34+) при расчете значения лейкоцитов CD45+ воспользуйтесь следующей формулой:

$$\% \text{ CD34+ НРС} = \frac{\text{Подсчет абсолютного количества CD34+ НРС (клеток/мкл)} \quad \times 100}{\text{Подсчет абсолютного количества лейкоцитов CD45+ (клеток/мкл)}} \\ \text{(то есть результаты распечатки области D)} \quad \text{(то есть результаты распечатки области A)}$$

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Убедитесь, что проточный цитометр настроен корректно в соответствии с рекомендациями производителя, приведенными в руководстве по работе с инструментом. С целью оптимизации настроек светорассеяния и флюоресценции в инструменте для анализа проб, окрашенных реагентом моноклональных антител CD45-FITC / CD34-PE и реагентом CD45-FITC / Isoclonic Control-PE, были установлены целевые значения интенсивности.

Флуорохромы FITC (флуоресцеин изотиоцианат), PE (фикоэритрин) и краситель 7-AAD (7-амино-актиномицин) при излучении имеют различные длины волн, однако они характеризуются некоторым спектральным перекрытием, которое должно быть скорректировано электронной компенсацией. Оптимальные уровни компенсации могут быть рассчитаны на двухпараметрической гистограмме путем анализа пробы крови с добавлением Stem-Trol Control Cells, окрашенных красителем жизнеспособности 7-AAD и подходящими компенсационными реагентами при использовании программного обеспечения CXP. В ходе этого анализа вносятся коррективы, дающие гарантию, что ни в одном квадранте дуальной окраски не произойдет окрашивания каким-либо индивидуальным флуорохромом.

Использование красителя 7-AAD (7-амино актиномицин D), разработанного для определения жизнеспособности, позволяет в ходе анализа с помощью проточной цитометрии выявить нежизнеспособные клетки с тем, чтобы произвести подсчет тех жизнеспособных клеток, которые представляют интерес для исследователя. Краситель впитывается мертвыми клетками (яркие события), что позволяет их впоследствии исключать из числа жизнеспособных клеток (негативные события) с помощью установки дискриминационного окна (см. гистограмму 8).

Перед анализом проб необходимо окрасить контроль для количественного определения (контрольные клетки Stem-Trol) с целью проверки реактивности антител.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Представленные производственные характеристики получены, исходя из использования реагентов Stem-Kit на проточном цитометре COULTER EPICS XL/XL-MCL с программным обеспечением System II. Примеры характеристик цитометра FC 500, работающего на программном обеспечении CXP, приведены в stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP).

Ожидаемые значения для диапазонов нормы

Для установления диапазона нормальных значений были собраны образцы нормальной цельной крови (n = 117) мужчин (n = 58) и женщин (n = 59). Это исследование было проведено в сторонней экспертной лаборатории. Для каждого образца были подготовлены параллельные испытания в соответствии с инструкциями на вкладыше в упаковку реагентов Stem-Kit. Была произведена клеточная сортировка вручную и выполнен анализ для получения значений CD45+, CD34+ и CD34%.

Статистический анализ предполагает негауссово распределение собранных данных. На основании этих результатов для анализа данных был избран непараметрический (робастный) подход. Были получены показатели CD45+, CD34+ и CD34%. Результаты для CD45+ и CD34+ выражаются в абсолютных количествах (клеток/мкл), а для CD34% в процентах к общему количеству лейкоцитов, см. таблицу ниже.

Нормальная цельная кровь: диапазоны значений нормы

Ручной метод (проверка робастности)	n	CD45+ (клеток/мкл)				CD34+ (клеток/мкл)				CD34+ (%)			
		Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее	SD	Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее	SD	Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее	SD
Ручной	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Эти значения используются только в качестве примера. В каждой лаборатории должны быть установлены собственные диапазоны ожидаемых значений с учетом проб нормальных доноров из числа местного населения.

Линейность

В каждом из 10 последовательных разведений для 2 типов проб — для периферической цельной крови с добавлением CD34+ и для свежей мобилизованной периферической крови — были произведены параллельные измерения. Для концентраций CD34+ HPC был достигнут динамический диапазон от 0 до 2 000 клеток/мкл и чувствительность для низких концентраций от 0 до 150 клеток/мкл. В соответствии с инструкциями, приведенными на вкладыше в упаковку реагентов Stem-Kit, были приготовлены пробы, которые были затем проанализированы на проточном цитометре COULTER EPICS XL/XL-MCL. Значения выражены как абсолютные количества (клеток/мкл). Результаты были проанализированы методом линейной регрессии для сравнения ожидаемых и измеренных абсолютных количеств; расчеты были произведены для средних значений параллельных измерений за исключением эндогенных CD34+ клеток. См. следующие таблицы.

Углы наклона линий регрессии на графиках абсолютных количеств CD34+ HPC определяют математические критерии линейности. Линейность подтверждается также минимальной потенциальной систематической ошибкой, по полученным при анализе точкам пересечения графиков с осью y. Ожидаемые абсолютные количества демонстрируют хорошую корреляцию с полученными значениями этого параметра.

Результаты анализа цельной крови с добавлением определяемого антигена CD34+

График приведен в Приложении.

Результаты периферической крови (мобилизованные клетки)

График приведен в Приложении.

Точность метода (таблицы) (сравнение ожидаемых и полученных результатов)

Достоверность метода определяется как степень согласования между ожидаемыми и полученными результатами как для автоматизированного метода сортировки и анализа, так и для метода сортировки и анализа вручную. К свежей нормальной цельной периферической крови добавляли очищенные CD34+ клетки с доведением концентрации до 1 875 клеток/мкл. Подсчет клеток проверялся на гемоцитометре Малассе, после чего выполнялись последовательные разведения для получения растворов различных концентраций. Ожидаемые результаты сравнивали с полученными по средним значениям двух изменений, выполненных для каждого уровня разведения с помощью автоматической сортировки и анализа и сортировки и анализа вручную. Наклон линии и точка ее пересечения с осью ординат не выявляют статистически значимых различий между результатами сортировки и анализа и ожидаемыми результатами ни в случае ручного, ни в случае автоматического метода.

Точность метода — CD34+ (%)

График приведен в Приложении.

Точность метода — абсолютное количество CD34+ (клеток/мкл)

График приведен в Приложении.

Точность метода — общее количество лейкоцитов — CD45+ (клеток/мкл)

График приведен в Приложении.

Точность метода (сравнение результатов, полученных ручным и автоматическим методами)

В четырех сторонних экспертных лабораториях с использованием образцов свежей периферической цельной крови, свежего или оттаянного афереза, пуповинной крови и костного мозга была произведена сравнительная оценка точности автоматизированного и ручного методов системы stemONE. Был рассчитан 95% доверительный интервал (ДИ).

В соответствии с инструкциями, приведенными во вкладыше к упаковке реагентов Stem-Kit, в проточных цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL были подготовлены и проанализированы образцы свежей периферической цельной крови (n = 59 из трех лабораторий), свежих продуктов афереза (n = 51 из трех лабораторий), свежей пуповинной крови (n = 29 из двух лабораторий), свежего костного мозга (n = 33 из двух лабораторий), оттаянных продуктов афереза (n = 23 из одной лаборатории), оттаянной пуповинной крови (n = 31 из двух лабораторий) и оттаянного костного мозга (n = 20 из одной лаборатории). Была произведена ручная клеточная сортировка и выполнен анализ для получения показателей CD45+, CD34+ и CD34%.

Точность методов (рисунки)

Образцы свежей периферической цельной крови (n = 59)

График приведен в Приложении.

Образцы свежих продуктов афереза (n = 51)

График приведен в Приложении.

Образцы свежей пуповинной крови (n = 29)

График приведен в Приложении.

Свежие образцы костного мозга (n = 33)

График приведен в Приложении.

Образцы оттаянных продуктов афереза (n = 23)

График приведен в Приложении.

Образцы оттаянной пуповинной крови (n = 31)

График приведен в Приложении.

Оттаянные образцы костного мозга (n = 20)

График приведен в Приложении.

Прецизионность

Межлабораторная точность

Исследования проводились в пределах одного клинического учреждения тремя операторами, каждый из которых использовал отдельный проточный цитометр. Было идентифицировано три образца, представивших динамический диапазон CD34+ (0–2 000 клеток/мкл):

Нижний диапазон:	свежая, мобилизованная периферическая кровь
Средняя часть диапазона:	продукт афереза
Верхний диапазон:	продукт афереза

Эти образцы были разбиты на три аликвоты, каждый из трех операторов получил по одной аликвоте для каждого уровня (низкий, средний и высокий). В соответствии с инструкциями, приведенными на вкладыше в упаковку реагентов Stem-Kit из каждой аликвоты были приготовлены пробы ($n = 10$). Каждый оператор выполнял анализ на проточном цитометре EPICS XL, определяя методом ручной и автоматической сортировки и анализа содержание CD45+, CD34+ и процентное содержание CD34%. Полученные значения выражаются как в процентах (%) от общего числа лейкоцитов, так и в виде показателей абсолютного количества (клеток/мкл).

В нижеследующих таблицах представлены результаты исследования межлабораторной точности, где они сгруппированы по уровням. По результатам вычисления средних значений, стандартных отклонений и коэффициентов вариации при проведении параллельных испытаний абсолютные количества CD45+ и CD34+, а также процентное содержание CD34% продемонстрировали низкую вариабельность.

График приведен в Приложении.

Внутрилабораторное исследование точности

Из свежей периферической цельной крови, свежего костного мозга, а также свежих и оттаянных продуктов афереза и пуповинной крови, присланных из четырех сторонних экспертных лабораторий, был получен набор образцов, обеспечивший покрытие всего динамического диапазона исследования. В соответствии с инструкциями, содержащимися во вкладыше к упаковке реагентов Stem-Kit было приготовлено по десять проб каждого образца, которые затем были исследованы на проточных цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL с применением ручного метода сортировки и анализа для измерения значений CD45+, CD34+ и CD34%.

Значения CD45+, CD34+ и CD34%, представленные в нижеследующих таблицах, показывают, что метод анализа является воспроизводимым, как это подтверждается средними значениями, стандартными отклонениями и коэффициентами вариации, полученными в ходе этих измерений. Таблицы данных, представленные в ПРИЛОЖЕНИИ, демонстрируют показатели внутрилабораторной точности для испытания.

График приведен в приложении.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Ознакомьтесь со stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP), прилагаемым к программному обеспечению системы stemCXP, для получения информации по ограничениям, которые нужно соблюдать при использовании автоматического метода.

- Окрашенные и лизированные пробы требуется хранить на льду и анализировать на проточном цитометре в соответствии с информацией в разделе «Стабильность обработанной пробы», в противном случае возможно получение ошибочных результатов.
- Реактивы нельзя разводить, делить на аликвоты или замораживать. Использовать только в оригинальной упаковке.
- Реагенты предназначены только для использования при проведении проточной цитометрии.
- Для достижения оптимального окрашивания следует соблюдать правила оттаивания замороженных образцов.
- При следующих условиях может оказаться, что не все эритроциты будут лизированы: наличие ядерных форм эритроцитов, отклонения в концентрации белка, или гемоглобинопатия. При этом результаты подсчета CD34% могут оказаться искусственно заниженными, поскольку нелизированные эритроциты будут сосчитаны как лейкоциты. Это не должно сказаться на измерении абсолютных количеств CD34+ и CD45+.
- В случае некоторых пациентов могут возникать особые проблемы ввиду измененных или очень низких количеств клеточных популяций.
- Результаты, полученные при проточной цитометрии, могут оказаться ошибочными, если дискриминационные окна были установлены неправильно.
- Реагенты Stem-Kit разработаны для того, чтобы с помощью красителя жизнеспособности 7-AAD определять жизнеспособные клетки HPC. Если в вашей лаборатории используются другие методы определения

жизнеспособности, для обеспечения надлежащего качества сообщаемых результатов следуйте общим рекомендациям по работе в лаборатории и процедурам контроля качества, принятым в вашей лаборатории.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter, Inc. в Соединенных Штатах и других странах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

www.beckmancoulter.com

Определения символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Stem-Kit reagentid

REF IM3630 50 analüüsi

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks

KASUTUSOTSTARVE

Stem-Kit reagentid koosnevad kahevärvilisest fluorestseerivast (FITC, PE) hiire monoklonaalse antikeha reagentist, kahevärvilisest hiire fluorestseerivast (FITC, PE) isokloonilisest kontrollist, absoluutarvu reagentist, raku elujõulisuse reagentist ja lüüsimisreagentist. See on mõeldud kasutamiseks *in vitro* diagnostikas voolu tsütomeetria abil CD45+ ja kaksikpositiivsete CD45+ CD34+ rakupopulatsioonide protsentide ja absoluutarvude samaaegseks tuvastamiseks ja loenduseks bioloogilistes proovides. Bioloogilised proovid sisaldavad värsket normaalset või mobiliseeritud perifeerset täisverd ning värsked või sulatatud afereesi aineid, nabanööri verd ja luuüdi. Rakupopulatsioonide mõõtmisi saab teha automaatselt või manuaalsel lüüsimis- ja analüüsimetodil.

Vt sellelt Stem-Kiti reagentide pakendi infolehel manuaalse meetodi kasutamise täieliku juhendit. Automaatmeetodi kasutamisel lugege täielike juhiste saamiseks tarkvarakomplektiga stemCXP 2.0 ja stemCXP, versioon 2.0, WIN 7 kaasas olevat stemCXP System Guide (stemCXP süsteemi juhendit).

KOKKUVÕTE

Hematopoeetilised eelrakud (HPC)

Stem-Kiti reagentid on välja töötatud inimese hematopoeetiliste eelrakkude (HPC) tuvastamiseks järgmiste kriteeriumide abil: tõelised CD34+ rakud (a) avaldavad CD34-antigeeni, (b) avaldavad CD45-antigeeni blastrakkude värvumisintensiivsusega (st on kergesti tuvastatavad, kuid madalamatel tasemetel kui lümfotsüüdid ja monotsüüdid) ning (c) neil on madal külgmise nurkvalgusega ja madal kuni keskmine ettepoole suunatud nurkvalgusega pärihajumine nagu blastrakkudel (1). Summad CD34+ HPC väljajätmine CD34+ HPC loendusest saavutatakse elujõulisuse eristamise reagenti 7-AAD kasutamisega (2).

CD34

CD34-antigeen kuulub diferentseeritult glükosüleeritud I tüüpi transmembraansete üksikahelaliste glükoproteiinide perekonda (3, 4, 5). See avaldub peaaegu kõigil hematopoeetilistel prekursorakkudel, sh multipotentsetel tüvirakkudel. CD34 epitoobid jaotuvad kolme klassi nende tundlikkuse järgi neuraminidaasi ja *Pasteurella haemolytica* glükoproteaasi suhtes (6). CD34 monoklonaalne antikeha (mAb), mida kasutatakse Stem-Kiti reagentides, kannab nime 581. See tunneb spetsiifiliselt ära CD34 molekuli III klassi epitoobi (7) ensümaatilise lõhustamise mustrite järgi määratletuna (6, 8). See 581 monoklonaalne antikeha määrati CD34-le töötoas 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5. HLDA töötuba inimese leukotsüüte diferentseerivate antigeenide alal) Bostonis, Massachusettsis, USA-s aastal 1993 (7).

CD45

CD45-antikeha tunneb ära CD45 perekonna panleukotsüüdi antigeene molekulmassidega 180, 190, 210 ja 220 kD (9, 10, 11). See on tuntud ka leukotsüüdi üldise antigeenina (LCA). CD45 antigeen avaldub igat tüüpi vereloomerakkudel, v.a täiskasvanute erütrotsüütidel ja nende vahetutel eelkäijatel (11, 12). Seda pole tuvastatud diferentseeritud mittehmatopoeetilises koes (12, 13, 14, 15). CD45 mAb, mida kasutatakse Stem-Kiti reagentides, kannab nime J33. See määrati CD45-le töötoas 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3. HLDA töötuba inimese leukotsüüte diferentseerivate antigeenide alal), mis peeti 1986. aastal Inglismaal Oxfordis (16).

7-AAD

7-aminoaktimütsiin D (7-AAD) elujõulisust eristav värvaine on aktinomütsiin D analoog, mis sisaldab asendatud aminorühma kromofoori asukohas 7. Elujõulisuse eristamise reagent 7-AAD lisandub DNA tsütosiini- ja guaniinibaaside vahele (15). Aktinomütsiinid on bioaktiivsed ained, mis sisaldavad 2-amino-4, 6 dimetüülfenoksasoon-3-kromofoori ja kahte tsükliilist pentapeptiidi (17). Aktinomütsiinid moodustavad stabiilseid komplekse kaheahelalise desoksüribonukleotiidhappega (DNA), kuid mitte kaheahelalise ribonukleiidhappega (RNA), RNA-DNA-hübriidide ega üheaahelalise DNA või RNA-ga (15, 18).

Elujõulisuse eristamise reagenti 7-AAD spektraalsed omadused teevad selle molekuli voolu tsütomeetria analüüsiks eriti hästi sobivaks (17). 7-AAD/DNA kompleksi maksimaalne imendumine asub rohelises spektriosas ja on seega sobilik argoonlaseriga tsütomeetri jaoks (impulsi lainepikkus 488 nm(15). Reagenti 7-AAD sügavpunane fluorestentsieritus (635 kuni 675 nm) teeb selle proovivahendi kasutamise lihtsamaks koos fluorestseerimisotsüanaadi (FITC) ja fukoerütiiniga (PE) konjugeerunud antikehadega, kuna vastupidiselt propiidiumjodiidile (PI) on 7-AAD / DNA kompleksi spektraalne kattuvus FITC ja PE-ga minimaalne (17).

Apoptotilised ja nekrootilised rakud ja/või kahjustatud rakud on elujõuliste rakkude analüüsimisel voolu tsütomeetria segavaks mõjaks. Mitteelujõulisi rakke tuleks hinnata ja eristada, keskendudes 7-AAD-positiivsele värvumisele, samal ajal kui elujõulised rakud ei värvu (negatiivsed) (19).

Voolu tsütomeetri süsteemid

Voolu tsütomeetri süsteemid (FC 500) rakendavad voolu tsütomeetria põhimõtteid, et analüüsida bioloogilisi proove kasutatavate monoklonaalsete antikehade ja fluorokroomide poolt kindlaksmääratud erinevate rakupopulatsioonide tuvastamiseks. Praegune test kasutab proovide analüüsimiseks CXP süsteemi tarkvaraga varustatud FC 500 läbivoolutsütomeetri süsteemi.

PÕHIMÕTE

See katse oleneb monoklonaalsete antikehade võimest siduda eraldiseisvaid antigeenseid determinante avaldavate rakkude pinda. Reagent CD45-FITC / CD34-PE Stem-Kiti reagentide komplektis on kombinatsioon kahest hiire monoklonaalsest antikehast, mis mõlemad on konjugeerunud spetsiifilise fluorokroomi ja erineva raku jaoks spetsiifilise pinnaantigeeniga. Spetsiifiline rakupinna värvimine saavutatakse, inkubeerides bioloogilise proovi paralleelseid proove kahevärvilise reagendiga CD45-FITC / CD34-PE.

Sama proovi lisatakse värvitakse reagendiga CD45-FITC / IsoClonic Control-PE, et kontrollida CD34-PE monoklonaalse antikeha mittespetsiifilist seondumist. Elujõulisuse eristamise reagent 7-AAD, nukleiinhappest koosnev värv, mis seondub ligipääsetavatele põhipaaridele (raku DNA), on kasutusel elujõuliste ja mitteelujõuliste rakkude eristamiseks. Vere punalibled igas proovis lüüsitakse lüüsimislahusega NH₄Cl, mis on valmistatud suhtega 1X. Lisatakse Stem-Count või Flow-Count fluorosfääre (absoluutarvu reagent) ning ülejäänud rakke analüüsitakse voolu tsütomeetria abil. Protsessi juhtimiseks ja analüüsi kvaliteedikontrolliks kasutatakse instrumendi ja proovi kvaliteedikontrolli reagente: Flow-Check fluorosfäärid, Flow-Set fluorosfäärid või sobivad kompenseerimisreagentid ning Stem-Trol Control Cells.

NÄITEID KASUTUSEST MEDITSIINIS

Hematopoeetiliste eelrakkude (HPC) varasemad teadusaruanded näitavad, et varasemates uuringutes toetuti kvantifitseerimisel tuumaga rakkude arvudele. Järgmised uuringud, millesse kaasati kolooniaid moodustavate ühikute (CFU) analüüsid, näitasid eelrakkude populatsioonide umbkaudseid hinnanguid. Ajaliselt intensiivsetele CFU-analüüsidele järgnes CD34-rakupinnamolekuli avastamine. CD34 leiti varaste hematopoeetiliste rakkude pinnalt ja hematopoeetiliste kolooniaid moodustavate rakkude pinnalt luuüdis ja perifeerses veres (20). Seejärel arendati välja CD34 molekuli vastu suunatud monoklonaalsed antikehad ja neid hakati voolu tsütomeetrias kasutama. CD34 määramised voolu tsütomeetria abil on nüüd laialdaselt tunnustatud vahendina hematopoeetiliste eelrakkude ja tüvirakkude hindamiseks.

Normaalse luuüdis isikutel on 1 kuni 3% CD34-antigeeniga rakkudest võimalised pikaajalise multilineaarse hematopoeesi taastamiseks (3, 20). Normaalsete isikute perifeerses veres avaldub CD34-antigeen vähem kui 0,1% ringlevatest rakkudest (1, 21). Stem-Kiti reagentide kasutamine on lihtne, kiire ja tundlik voolutsütomeetriline meetod hematopoeetiliste progenitorrakkude ja tüvirakkude, loendamiseks perifeerses veres, leukefereesiproduktides, luuüdis ja nabanõrveres.

REAGENDI SISU

Stem-Kiti reagentid sisaldavad järgmisi aineid:

- CD45-FITC / CD34-PE reagent (45/34) – 1 viaal.
- CD45-FITC / IsoClonic Control-PE reagent (45/CTRL) – 1 viaal.
- Stem-Counti fluorosfäärid – 1 viaal.
- 7-AAD elujõulisuse eristamise reagent – 1 viaal
- 10X NH₄Cl lüüsimislahus – 2 viaali.

1. Neid reagente tuleb kasutada koos, nagu nad komplektis on.

Flow-Counti fluorosfääre, mis on võrdväärsed Stem-Counti fluorosfääridega, saab kasutada absoluutarvu määratlemiseks, kui kasutusel on spetsiifiline hinnatud kontsentratsioon.

2. CD45-FITC / CD34-PE on kasutusvalmis kahevärviline reagent, mis tarnitakse 2,2 ml fosfaatpuhverdatud soolalahuses (PBS), mis sisaldab 2 mg/ml veiseseerumi albumiini (BSA) ja 0,1% naatriumasiidi säilitusainena.
3. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE on kasutusvalmis kahevärviline reagent, mis tarnitakse 1,2 ml fosfaatpuhverdatud soolalahuses (PBS), mis sisaldab 2 mg/ml veiseseerumi albumiini (BSA) ja 0,1% naatriumasiidi säilitusainena. Reagent CD45-FITC / IsoClonic Control-PE on segu konjugeerumata ja PE-konjugeerunud (CD34-identsest) 581 monoklonaalsest antikehast. See segu toimib sobiva isomorfse kontrollainena CD34-PE mAb mittespetsiifilise sidumise kontrollimiseks igas proovis.

MÄRKUS: Reagente CD45-FITC / CD34-PE ja CD45-FITC / IsoClonic Control-PE ei tohi eraldada. Katsete ja kontrollide tegemisel tuleks hoolikalt jälgida, et mõlemal reagentil oleks viaali sildil sama partinumber.

Antikehade omaduste kokkuvõte

Spetsiifilisus	CD45	CD34
Kloon	J33	581
Hübridoom	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogeen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig ahel	IgG1, κ valgusahelad	IgG1, κ valgusahelad
Liigid	Hiir	Hiir
Konjugatsioon	Fluorestseiniisotiotsüanaat (FITC)	R fükoerütiin (PE)
Molaarsuhe	5–8 mooli FITC / mooli Ig	0,5–1,5 mooli PE / mooli Ig

Spetsiifilisus	CD45	CD34
Ergastuslainepikkus	488 nm (sinine-roheline)	488 nm (sinine-roheline)
Fluorestsentsierit	564 kuni 541 nm (peamiselt roheline)	568 kuni 590 nm (peamiselt oranž)

- Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfäärid koosnevad 10 µm (nimidiameeter) polüstüreenist fluorestskeerivatest mikrosfääridest surfaktanti ja 1% formaldehüüdi sisaldavas 20 ml vesisuspensioonis. Iga fluorsfäär sisaldab värvi, mille fluorestsentsmissiooni vahemik on 488 nm juures ergastumisel 525–700 nm. Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride analüüsitud kontsentratsioon (fluorosfääri/µl) tuletatakse mitmest kordusanalüüsist COULTERI osakeste suuruse analüsaatoril. Partiispetsiifiline väärtus on kirjas viaali sildil.
- Elujõulisuse eristamise reagent 7-AAD on saadaval 99% fosfaatpuhverdatud soolalahuses (PBS: 0,01 M naatriumfosfaati, 0,145 M naatriumkloriidi, pH 7,2) koos 1% dimetüülsulfoksiidiga (DMSO).
- Lüüsimislahus NH₄Cl on saadaval 10X kontsenteeritud 20 ml lahusega. See sisaldab segu ammooniumkloriidist (NH₄Cl), kaaliumbikarbonaadist (KHCO₂) ja dikaalium-etuendiamiintetraatsetaadist (EDTA).

HOIATUS JA ETTEVAATUSABINÕUD

- Monoklonaalse antikeha preparaadid sisaldavad 0,1% naatriumasiidi. Naatriumasiid toodab happelises keskkonnas ülimürgist vesinikasiidhapet. Kanalisatsiooni kaudu äraviskamisel tuleks lisada suures koguses voolavat vett, et vältida ohtlikku kogunemist metallitorudesse ja võimalikke plahvatusi.
- Naha või silmadega kokku puutunud näidisproove, proove ja materjale tuleb käsitseda nakkust edasikandvate ainetena ning need tuleb ära visata õiged ettevaatusabinõusid järgides.
- Ärge pipettige kunagi suu kaudu ning vältige proovide ja reagentide kontakti naha ja limaskestadega.
- Ärge kasutage reagentide pärast viaali sildil olevat aegumiskuupäeva.
- Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfäärid sisaldavad 1% formaldehüüdi. Vältige kokkupuudet naha ja silmadega, kuna formaldehüüd võib neis kudedes tekitada pöördumatuid kahjustusi. Ärge hingake sisse auru. Kandke sobivaid kaitsevahendeid, nagu kindaid ja kaitseprille.
- Ärge laske Stem-Kiti reagentidel säilitamise või kasutamise ajal tugeva valguse või kuumusega kokku puutuda.
- Vältige Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride ja proovide aurustumist ning lekkimist, see võib põhjustada valesid tulemusi. Pärast kasutamist sulgege viaalid tihedalt ja hoiustage neid püstiasendis.
- Enne kasutamist veenduge, et fluorosfäärid on korralikult uuesti suspendeeritud. Vältige liigset segamist, vältimaks õhumullide moodustumist. Ärge tilgutage pipetist õhumulle, kuna see võib viia vigaste tulemusteni.
- Kasutage proovide ja Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride väljutamiseks kalibreeritud pipetti (eelistatavalt positiivse nihkega või repiiterpipetti), et vältida vigaseid tulemusi.
- Kasutage pipetitootja soovitatud tilgutamistehnikaid, et tagada proovide ja Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride täpne ning kordustäpne pipettimine ja vältida vigaseid tulemusi.
- Värvitud ja lüüsitud proove tuleb hoida jääl ja analüüsida voolutsütomeetril jaotises „Töödeldud proovi stabiilsus“ toodud teabe kohaselt, sest muidu võivad tulemused osutuda ekslikeks.
- Veenduge, et loendatakse vähemalt 1000 Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääri, vastasel korral ei toimu tulemuste automaatset teisendamist absoluutarvudeks.
- Igas Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride partiis on kindel kontsentratsioon fluorosfääre. Absoluutarvude määramisel veenduge, et kasutatakse õiget analüüsitud kontsentratsiooni.
- Pesuetappi vajavaid ettevalmistamise meetodeid ei tohiks kasutada, kuna nendega kaasneb rakkude tundmatu kadu.
- Määratletutest erinevate inkubatsiooni- või segamisaegade või temperatuuride kasutamine võib viia vigaste tulemusteni.
- Elujõulisuse eristamise reagent 7-AAD sisaldab 0,005% 7-AAD. Puhas 7-AAD on võimalik kantserogeen. Kuigi see aine on tugevalt lahjendatud, soovime vältida selle kokkupuudet naha ja silmadega, kanda sobivat kaitseriietust ja kindaid ning sobivad silmade / näokaitset.
- Elujõulisuse eristamise reagent 7-AAD sisaldab 1% dimetüülsulfoksiidi (DMSO). Puhas DMSO tekitab ärritust. Kuigi see aine on lahjendatud, soovime vältida selle kokkupuudet naha ja silmadega, kanda sobivat kaitseriietust ja kindaid ning sobivad silmade / näokaitset.
- Kromofoorina on 7-AAD valgustundlik. Hoidke elujõulisuse eristamise reagenti 7-AAD komplekti papist pakendis, et vältida hoiustamise ajal püsivat kokkupuudet valgusega.
- Minimeerige segatud proovide kokkupuudet valgusega inkubatsiooni ajal.
- Kasutage reagentide käsitlemisel üldtunnustatud häid laboritavasid.

GHS-I OHUKLASSIFIKATSIOON

Stem-Count fluorokuulikesed

ETTEVAATUST



H316

Põhjustab kerget nahaärritust.

H317

Võib põhjustada allergilist nahareaktsiooni.

H350

Võib põhjustada vähktõbe.

P201

Enne kasutamist tutvuda erijuhistega.

P280

Kanda kaitsekindaid, kaitserõivastust ja kaitseprille/kaitsemaski.

P308+P313

Kokkupuutel või küsimuste tekkimisel: pöörduda arsti poole.

P333+P313

Nahaärrituse või lööbe korral: pöörduda arsti poole.

P362+P364

Võtta saastunud rõivad seljast ja pesta neid enne järgmist kasutamist.

Formaldehüüd 0,5 - 1,0% reaktsioonimass:

5-kloro-2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon [EÜ nr 247-500-7] ja

2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon [EÜ nr 220-239-6] (3:1) < 0,05%

7-AAD eluvõime värv

HOIATUS

H316

Põhjustab kerget nahaärritust.

P332+P313

Nahaärrituse korral: pöörduda arsti poole.

Dimetüülsulfoksiid 0,5 - 2%



Ohutuskaart on kättesaadav veebilehel beckman.com/techdocs

HOIUTINGIMUSED JA STABIILSUS

Avamata reagent on stabiilne kuni viaalil toodud aegumiskuupäevani, kui seda hoitakse temperatuuril 2–8 °C valguseta keskkonnas. Ärge kasutage pärast kõlblikkusaega. Ärge külmutage. Stem-Kiti reagentid on stabiilsed 30 päeva pärast Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride viaali avamist. Avatud viaalid tuleb kohe pärast kasutamist uuesti korgistada ja säilitada temperatuuril 2–8 °C valguseta keskkonnas. ÄRGE jaotage Stem-Counti ega Flow-Counti fluorosfääre nende originaalviaalist mujale.

OLULINE: Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride lekkimise korral esineb vigaste tulemuste oht. Pärast avamist tuleb Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääre säilitada püstiasendis, et vältida leket. Reagente ei tohiks kasutada, kui esinevad lekkimise tunnused.

Riknemise tunnused

Riknemise tunnused võivad ilmnedä järgmistes olukordades:

Stem-Kiti reagentid, välja arvatud Stem-Counti fluorosfäärid

- Normaalse välimuse muutused on loetletud allpool

Reagent	Normaalne välimus
CD45-FITC / CD34-PE	Läbipaistev, õrnalt roosa vedelik
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Vedeliku värvus läbipaistev kuni õrnalt roosa
7-AAD eluvõime värv	Selge, õrnalt roosa kuni punakas vedelik
Lüüsimislahus NH ₄ CL	Läbipaistev värvitu vedelik

Stem-Count Fluorospheres

- Rohkem kui 20% fluorosfääride kogupopulatsioonist sisaldavate sekundaarsete fluorestsentspopulatsioonide välimus valmendamise ajal.
- Suur varieeruvus arvude või proovide jaoks saadud väärtustes.

OLULINE: Reagente ei tohiks kasutada, kui esineb riknemise tunnuseid, kuna nii võib saada vigased tulemused. Riknemise tunnuste esinemisel võtke ühendust Beckman Coulteri esindajaga.

Reagendi ettevalmistamine

1. Kahevärvilisi reagente CD45-FITC / CD34-PE ja CD45-FITC / IsoClonic Control-PE kasutatakse lahjendamata kujul otse viaalidest.
2. Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääre kasutatakse otse viaalist, lahjendamata. Pudeli ülaosast tuleb esmakordsel avamisel eemaldada kogu kuumtihendi alumiinium. Vajalik on õige segamine. Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride viaali esmakordsel käsitlemisel päeva alguses keerutage seda 3–5 sekundit.

Enne viaalist tilgutamist aktiveerige kergelt, pöörates viaali 3–5 korda ümber.

Pärast esmast keerutamist päeva alguses viige fluorosfääri viaalid kasutamiseni tagasi temperatuurile 2–8 °C.

Aurustumise ja lekkimise vältimiseks sulgege pärast kasutamist viaali kork tugevasti.

3. Elujõulisuse eristamise reagenti 7-AAD kasutatakse lahjendamata kujul otse viaalist.
4. Lüüsimislahust 1X NH₄Cl tuleb valmistada iga päev: lisage üheksa ühikut deioniseeritud vett ühe ühiku 10X kontsentreeritud lüüsimislahuse NH₄Cl kohta. Mitte külmutada. Visake kasutamata lüüsimislahus 1X NH₄Cl päeva lõpus ära.

Tooge kõik reagentid enne kasutamist toatemperatuurile (18–25 °C).

PROOVI KÄSITSEMINE

Proovi nõuded

Proovide käsitlemise kokkuvõte:

Proovituüp	Värava lisamise meetod	Hoiutemperatuur	Proovi vanus
Aferees	Algoritm	2–8 °C	24 tundi
	Käsitsi	2–8 °C	24 tundi
Luuüdi	Algoritm	2–8 °C	24 tundi
	Käsitsi	2–8 °C	24 tundi
Nabanööri veri	Algoritm	18–25 °C	24 tundi
	Käsitsi	18–25 °C	24 tundi
Tavaline täisveri	Algoritm	18–25 °C	20 tundi
	Käsitsi	18–25 °C	20 tundi
Mobiliseeritud täisveri	Algoritm	18–25 °C	20 tundi
	Käsitsi	18–25 °C	20 tundi

1. Bioloogilised proovid sisaldavad värsket normaalset või mobiliseeritud perifeerset täisverd ning värsked või sulatatud afereesi aineid, nabanööri verd ja luuüdi.
2. Manipuleeritud või puhastatud hemotopoeetilisi eelrakke (HPC) saab analüüsida ainult manuaalse lüüsimismeetodiga.
3. Koguge afereesi teel saadud komponendid, perifeerse vere proovid, nabanööri vere proovid või luuüdi proovid aseptiliselt steriilsetesse vaakumiga verevõtukatsutitesse, milles on antikoagulandina KHA-A või K3-EDTA.
4. Antikoagulandiga katsutitesse kogutud täisvere ja mobiliseeritud täisvere proove võib enne värvimist hoida toatemperatuuril (18–25 °C) kuni 20 tundi.
5. Antikoagulandiga katsutitesse kogutud nabanööri vere proove võib enne värvimist hoida toatemperatuuril (18–25 °C) kuni 24 tundi.
6. Afereesi teel kogutud komponente ja luuüdi proove võib enne värvimist hoida kuni 24 tundi temperatuuril 2–8 °C.
7. Enne proovi ettevalmistamist veenduge, et valgeliblede (WBC) kontsentratsioon ei oleks suurem kui 30×10^9 WBC/l. Kui vaja, lahjendage proovi HBSS-i (Hanki tasakaalustatud soolalahuse) või sellele võrdväärse ainega, et saavutada keskmine väärtus 15×10^9 WBC/l. Salvestage lahjenduskoeffitsient lõpliku HPC-de absoluutarvu väljaarvutamiseks.
8. Madalad proteiinikontsentratsioonid võivad põhjustada Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride kogumite tekkimist ja anda tulemuseks väärtalt kõrgeid rakkude absoluutarve. Madala proteiinikontsentratsiooniga proovide lahjendamine peab toimuma proteiiniga rikastatud puhverlahust kasutades.
9. Kõiki proove tuleks töödelda Stem-Kiti reagentidega, sh elujõulisuse eristamise reagentiga 7-AAD.

Proovide töötlemise protseduur

Tehke katsed duplitseeritud, järgides juhiseid The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (ISHAGE-i juhised CD34+ rakkude tuvastamiseks voolu tsütomeetria abil) (1).

MÄRKUS: Stem-Trol- kontrollrakkude töötamiseks vt täielikku juhendit manuaalse meetodi kasutamisel teavet Stem-Trol-kontrollrakkude pakendi infolehel. Vt automaatse meetodi kasutamiseks täielike juhiste saamiseks stemONE-i süsteemi tarkvaraga kaasasolevat juhendit stemONE System Guide (stemONE-i süsteemijuhend) ja stemCXP süsteemi tarkvaraga kaasasolevat juhendit stemCXP System Guide (stemCXP süsteemijuhend).

1. Sildistage iga proovi jaoks kolm katsutit järgmiselt:

- 45/34/7-AAD #1
- 45/34/7-AAD #2
- 45/CTRL/7-AAD

2. Tilgutage 20 µl reagenti CD45-FITC / CD34-PE katsutitesse: 45/34/7-AAD #1 ja 45/34/7-AAD #2.

3. Tilgutage 20 µl reagenti CD45-FITC / IsoClonic Control-PE katsutisse: 45/CTRL/7-AAD.

4. Tilgutage kõigisse katsutitesse 20 µl elujõulisuse eristamise reagenti 7-AAD.

OLULINE: Kui vereproov jääb katsuti ülaosasse või küljele, püsib mittetäieliku lüüsi risk. Olge tilgutamisel ettevaatlik, et veri ei puutuks kokku katsuti ülaosa või küljega. Kui vaja, puhastage katsuti vatitupsuga, et kõik vereproovi jäägid katsuti ülaosast või küljelt eemaldada.

5. Tilgutage 100 µl patsiendiproovi positiivse nihkega pipeti või repliitertpipetiga katsutisse.

6. Keerutage katsutit kohe 5 sekundit.

7. Inkubeerige kõiki katsuteid 20 minutit toatemperatuuril (18–25 °C) valguse eest kaitstult.

8. Pärast inkubeerimist lisage 2 ml ettevalmistatud 1X NH₄Cl lüüsimislahust igasse katsutisse ja keerutage kohe 5 sekundit.

MÄRKUS: Üksikasju lüüsimislahuse ettevalmistamise kohta vt ülalolevast jaotisest 7.2 pealkirjaga REAGENDI ETTEVALMISTAMINE.

OLULINE: Õhumullide tilgutamisel pipetist esineb vigaste tulemuste oht. Ligne Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride segamine võib tekitada õhumulle. Ärge segage Stem-Counti ega Flow-Counti fluorosfääre liigselt ega tilgutage õhumulle katsutitesse.

9. Inkubeerige toatemperatuuril valguse eest kaitstuna 10 minutit.

10. Segage Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääre õrnalt, pöörates viaali enne kasutamist 3–5 korda ümber.

11. Enne andmete kogumist ja kohe pärast 9. etappi, kasutades positiivse survega või korduspipetti, pipeteerige 100 µl Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääre kõigisse kolme katsutisse.

12. Keerutage iga katsutit kohe 5 sekundit.

MÄRKUS: Üksikasju lüüsimislahuse ettevalmistamise kohta vt ülalolevast jaotisest 7.2 pealkirjaga REAGENDI ETTEVALMISTAMINE.

Proovi värvimise kokkuvõte

Reagendid / proovid	45/34/7-AAD #1	Proovikatsuti silt 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µl	20 µl	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µl
7-AAD eluvõime värv	20 µl	20 µl	20 µl
Proov	100 µl	100 µl	100 µl
Vortex – inkubeerige toatemperatuuril 20 minutit. Kaitske valguse eest.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 ml	2 ml	2 ml
Vortex – inkubeerige toatemperatuuril 10 minutit. Kaitske valguse eest.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µl	100 µl	100 µl
Keerissegamine			
Kogutud afereesi teel saadud komponentide, nabanööri vere ja luuüdi proovide korral ärge laske proovidel enne andmete kogumist seista jääl rohkem kui 60 minutit.			
Täisvere ja mobiliseeritud täisvere proovide korral ärge laske proovidel enne andmete kogumist seista jääl rohkem kui 45 minutit.			

Reagendid / proovid	45/34/7-AAD #1	Proovikatsuti silt 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
Ülessulatatud proovi tuleb kohe analüüsida.			
Kaitske valguse eest			

Töödeldud proovi stabiilsus

- Kogutud afereesi teel saadud komponentide, nabanööri ja luuüdi proovide korral ärge laske proovidel enne andmete kogumist seista jääl rohkem kui 60 minutit pärast Stem-Count või Flow-Count fluorosfääride lisamist.
- Täisvere ja mobiliseeritud täisvere proovide korral ärge laske proovidel enne andmete kogumist seista jääl rohkem kui 45 minutit pärast Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride lisamist.
- Külmutatud proovi korral tuleb andmed koguda kohe pärast Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride lisamist.
- Töödeldud proove tuleb hoida jääl valguse eest kaitstult ja piirata andmete kogumisel nii palju kui võimalik RT oldud aega.

SISU

Naatriumasiidist konservant võib moodustada metallist kanalisatsioonitorudes plahvatusohtlikke ühendeid. Vt asutuse NIOSH teadaannet. Explosive Azide Hazard (Plahvatusohtliku asiidi oht) (16.8.76).

Vältimaks võimalikku asiidiühendite akumulereerimist, loputage äravoolutorusid pärast lahjendamata reagendi kõrvaldamist. Naatriumasiidi kõrvaldamine peab olema kooskõlas asjakohaste kohalike eeskirjadega.

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID

- Deioniseeritud vesi.
- Hanki tasakaalustatud soolalahus (HBSS) või sellega võrdväärne aine
- Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
- Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
- Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
- CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
- QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
- Alternatiiv Stem-Counti fluorosfääridele: Flow-Counti fluorosfäärid (REF 7547053)
- Jääveevann
- Plastikust proovikatsutid (12 × 75 mm)
- Kaliibritud repiiterpipett (20 µl, 100 µl, 2 ml) ja otsakud või kaliibritud positiivse nihkega pipetid (20 µl, 100 µl, 2 ml) ja otsakud
- Kaliibritud standardpipett (20 µl, 100 µl, 2 ml) ja otsakud.
- Vortex-segisti.
- Taimer.
- Voolutsütomeeter.
- stemCXP 2.0 tarkvarakomplekt, stemCXP versioon 2.0, WIN 7, AINULT CXP tarkvaraga (versioon 2.0) varustatud FC 500 läbivoolutsütomeetri süsteemi proovide automatiseeritud analüüsiks.

TULEMUSED

Analüüsiprotokolli seadistus

Voolu tsütomeeter peab olema seatud tuvastama pärihajumist, külghajumist ja nelja fluorestentskanalit. FL3-kanali jaoks (Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride jälgimiseks) kasutage 620 nm segmenteerimata läbivat filtrit. FL4-kanali jaoks (elujõulisuse eristamise reagendi 7-AAD jälgimiseks) kasutage 675 nm pikka läbivat filtrit.

Veenduge, et voolu tsütomeeter oleks fluorestentsi intensiivsuse jaoks õigesti kalibreeritud ja standardiseeritud.

Veenduge, et voolu tsütomeeter oleks fluorestentsi kompenseerimiseks õigesti reguleeritud.

MÄRKUS: Proovide analüüsimisel on kõigi piirkondade asendid ligikaudsed kuni valmendamise lõpuni katsutis 45/34/7-AAD #1. Piirkondi ei optimeerita järgmise protokoll järgi ning neid EI reguleerita paneeli teise ja kolmanda katsuti jaoks.

Proovi analüüsimiseks tuleb järgida 8 histogrammi ja piiritlemisskeemi seeriat (vt altpoolt). Sama 8 histogrammi ja piiritlemisskeemi seeriat tuleb järgida CD34+ kontrollrakkude kasutamisel. Piirkondi A, B, C ja D (vt piirkonna määratlemiseks jaotist Piirkonna loomine) tuleb kohandada nii, et need sisaldaksid CD34+ kontrollrakkude omaduste klastrit.

Histogrammi loomine

Looge histogrammid järgmiselt:

1. Looge histogramm 1: FL1 CD45-FITC vs. külghajumine.
2. Looge histogramm 2: FL2 CD34-PE vs külghajumine.
3. Looge histogramm 3: FL1 CD45-FITC vs külghajumine.
4. Looge histogramm 4: pärihajumine vs külghajumine.
5. Looge histogramm 5: FL1 CD45-FITC vs FL2 CD34-PE.
6. Looge histogramm 6: pärihajumine vs külghajumine.
7. Looge histogramm 7: aeg vs FL3 Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfäärid.
8. Looge histogramm 8: FL4 7-AAD elujõulise eristamise värvaine vs külghajumine.

Histogrammid 1 kuni 4 on mõeldud CD34+ HPC iseloomustamiseks; see protsess võib edasi lükkuda analüüsi etappi. Esimesed neli histogrammi koostatakse juhiste ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (ISHAGE-i juhised CD34+ rakkude tuvastamiseks voolu tsütomeetria abil) (1, 2) järgi. Histogrammid 5 kuni 7 on mõeldud parameetrite jälgimiseks, mis on valmendamisetapi ajal olulised. Need sisaldavad pärihajumise selektorit, kogutavate CD45+ juhtumite arvu ja fluorosfääri üksikosade õiget kuhjumist.

Histogramm 8 on mõeldud oluliste sündmuste ebaolulistest eristamiseks ja analüüsimiseks.

Piirkonna loomine

Looge piirkonnad järgmiselt:

1. Histogramm 1: looge histogrammil 1 lineaarne piirkond A, et kaasata kõik CD45+ leukotsüüdid ja eemaldada vereliistakud, punaliblede jäägid ja kogumid.
2. Histogramm 1: looge histogrammil 1 amorfne piirkond E, et kaasata lümfotsüüdid (ere CD45, madal külghajumine).
3. Histogramm 2: looge histogrammil 2 lineaarne piirkond B, et kaasata kõik CD34+ sündmused. Määrake histogrammi 2 lõpparvuks 75 000 sündmust (CD45+ sündmust).
4. Histogramm 3: looge histogrammil 3 amorfne piirkond C, et kaasata kõik CD45dim kobarsündmused.
5. Histogramm 4: looge histogrammil 4 amorfne piirkond D, et kaasata kõik kobarsündmused keskmise külghajumisega ja keskmise kuni kõrge pärihajumisega.
6. Histogramm 5: looge Quadstati piirkond I histogrammil 5, et kinnitada CD45 avaldumise alampiir CD34+ sündmustel.
7. Histogramm 5 – looge histogrammil 5 amorfne piirkond H, mis ümbritseb kõiki Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääre, sh nende duplikaate. Piirkond H peaks asuma histogrammi 5 ülemises parempoolses nurgas.

MÄRKUS: Veenduge, et piirkond H joonistataks AMORFSE piirkonnana.

8. Histogramm 5: looge histogrammil 5 lineaarne piirkond K (nimega „listgate – “). Määrake piirkonna K piirid kahe parameetri histogrammi esimeses logi dekaadis. Piirkond K võimaldab valmendamise ajal kõrvaldada kaksiknegatiivsed sündmused, et analüüsida 75 000 olulist CD45+ sündmust.
9. Histogramm 6: kopeerige piirkond D histogrammilt 4 piirkonnana F histogrammil 6.
10. Histogramm 7 – looge histogrammil 7 lineaarne piirkond G, et kaasata ainult Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride üksikosad. Piirkonna G saab CD34+ HPC absoluutarvude automaatse arvutamise lubamiseks sildistada nimega CAL (vt üksikasju instrumendi juhendist).
11. Histogramm 8 – looge histogrammil 8 lineaarne piirkond J, et kaasata elujõulised leukotsüüdid (elujõulisuse eristamise reagenti 7-AAD negatiivsed sündmused).

Lüüsi loomine

Looge lüüsid järgmiselt.

1. Histogramm 1 – määrake histogrammi 1 väärtuseks J, et kuvada kõik olulised sündmused. Kui 7-AAD ei ole kasutusel, määrake piirkond -H histogrammile 1, et kuvada kõik sündmused peale Stem-Counti ja Flow-Counti fluorosfääride ja nende duplikaatide.
2. Histogramm 2 – määrake AJ (A, kui 7-AAD ei ole kasutusel) histogrammil 2, et kuvada kõik olulised (kõik, kui 7-AAD ei ole kasutusel) CD34+ sündmused.
3. Histogramm 3 – määrake A, B ja J (A ja B, kui 7-AAD ei ole kasutusel) histogrammil 3, et kuvada kõik olulised (kõik, kui 7-AAD ei ole kasutusel) CD45+ / CD34+ sündmused.
4. Histogramm 4 – määrake A, B, C ja J (A, B ja C, kui 7-AAD ei ole kasutusel) histogrammil 4, et kuvada olulised (kõik, kui 7-AAD ei ole kasutusel) CD45+ / CD34+ kobarsündmused madala külghajumisega, jättes välja vereliistakud ja jääkmaterjali. Piirkonna ABCDJ sündmused on tegelik elujõuline CD34+HPC.
5. Histogramm 5: kõigi sündmuste kuvamiseks piiritlemata.
6. Histogramm 6: määrake EJ (E, kui 7-AAD pole kasutusel) histogrammil 6, et kuvada olulised (kõik, kui 7-AAD pole kasutusel) lümfotsüüdid selektori visuaalse kontrollina.
7. Histogramm 7 – määrake histogrammil 7 H, et kuvada kõiki Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääre, sh nende duplikaate.
8. Histogramm 8: määrake histogrammi 8 väärtuseks A, et kuvada kõik CD45+ sündmused.

Voolu tsütomeetria seadistus

1. Kontrollige, et voolu tsütomeeter oleks õigesti joondatud ja optimeeritud andurite FL1, FL2, FL3 ja FL4 valguse hajuvuse ning fluorestentsi intensiivsuse jaoks tootja ja labori eeskirjade järgi. Kontrollige, et värvi kompenseerimine oleks määratud standardkasutuseks sobivaks.
2. Keerutage katsuteid 5 sekundit.
3. Valmendage andmed voolu tsütomeetril. Analüüsida tuleb vähemalt 75 000 CD45+ sündmust.
4. Proovi analüüsimiseks: reguleerige selektorit ja piirkondi, analüüsides proovikatsutit 45/34/7-AAD #1. Salvestage protokoll ning analüüsige 45/34/7-AAD #2 ja 45/CTRL/7-AAD katsuteid rohkemate reguleerimisteta.

Analüüsi näide

LISAS toodud histogrammid kuvatakse protokolli järgi tõusvas järjestuses.

CD34+ HPC väljaarvutamine proovi jaoks

CD34+ HPC arv arvutatakse välja piirkonna D statistiliste andmete põhjal kahe sama proovi eksemplari kohta (s.o 45/34/7-AAD #1 ja 45/34/7-AAD #2).

CD34+ HPC tulemused loetakse kehtivateks, kui reagentiga CD45-FITC / IsoClonic Control-PE saadud tulemused moodustavad vähem kui 10% CD34+ HPC tulemustest.

1. Keskmistage 45/34/7-AAD #1 ja 45/34/7-AAD #2 katsutitest saadud tulemused mõlema proovi kohta (s.o piirkonna D statistiliste andmete väljaprintitud tulemuste keskmine). CD34+ HPC arv võib jääda 10% sisse duplikaatproovide keskmisest. 45/CTRL/7-AAD kontrollkatsutiga saadud väärtus peab tulemuste valideerimiseks olema vähem kui 10% katsutitest saadud keskmisest väärtusest

MÄRKUSED: Kui duplitseeritud CD34+ HPC absoluutarvu keskmine jääb lubatud vahemikust väljapoole (st ületab 10%), kontrollige, kas tilgutamine tehti õigesti, eriti Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride puhul. Kontrollige visuaalselt voolu tsütomeetri aruandeid ning värvimis- ja lüüsimistoimingute kvaliteeti katsutites. Kontrollige piirkondade piiride määramise viisi.

Kui 45/CTRL/7-AAD-ga saadud väärtus jääb aktsepteeritavate väärtuste vahemikust välja (st ületab 10% duplikaadi jaoks saadud absoluutarvu keskmisest), kontrollige, kas tilgutamine tehti õigesti, eriti Stem-Counti või Flow-Counti fluorosfääride korral. Kontrollige visuaalselt voolu tsütomeetri aruandeid ning värvimis- ja lüüsimistoimingute kvaliteeti katsutites. Kontrollige piirkondade piiride määramise viisi.

Kui vaja, korrake valmendamisetappi, lisades pärast esimese duplikaadi katsutit 45/34/7-AAD #1 ja #2 ja enne 45/CTRL/7-AAD katsutit BLANK-katsuti. Kui vaja, korrake kogu ettevalmistust uute katsutitega, lisades BLANK-katsuti. Valmendage ja analüüsige nii uued kui eelmised katsutiseeriad. Võrrelge tulemusi. Kui need ei ühti, võtke ühendust kohaliku Beckman Coulteri esindajaga.

2. Kui proovi on lahjendatud, PEAB ülalpool saadud tulemuse korrutama sobiva lahjenduskoeffitsiendiga (Dil). Saadud lõpptulemus on CD34+ HPC absoluutarv (rakke/μl).

$$\text{CD34+ HPC absoluutarv (rakke/}\mu\text{l)} = \text{CD34+ HPC absoluutarvu väljaprinditud tulemus (rakke/}\mu\text{l)} \times \text{lahj}$$

3. Afereesipakkide jaoks saab CD34+ HPC koguarvu paki kohta välja arvutada järgmise valemiga:

$$\text{CD34+ HPC koguarv pakendi kohta} = \text{CD34+ HPC absoluutarv (rakke/}\mu\text{l)} \times 10^6 \times \text{pakendi ruumala (l)}$$

Kus

4. CD34+ HPC protsendi leidmiseks CD45+ leukotsüütide väärtuse arvutusest vt järgmist valemit:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{CD34+ HPC absoluutarv (rakke/}\mu\text{l)} \times 100}{\text{CD45+ leukotsüütide absoluutarv (rakke/}\mu\text{l)}} \times 100$$

(s.o piirkonna D väljaprinditud tulemused) (s.o piirkonna A väljaprinditud tulemused)

KVALITEEDIKONTROLL

Tagage, et voolu tsütomeeter oleks õigesti joondatud tootja soovitude kohaselt, mis on esitatud seadme juhendites. Sihtintensiivsused on määratud valgushajuvuse ja fluorestsentsi instrumendisäetete optimeerimiseks proovide analüüsimiseks, mida on värvitud CD45-FITC / CD34-PE monoklonaalse antikeha reagenti ja CD45-FITC / Isoclonic Control-PE reagentiga.

Fluorokroomide fluorestsentsiisotiotsüanaati (FITC), fukoerütriini (PE) ja 7-aminoaktimütsiini D värvaine (7-AAD) kiirgavad erinevatel lainepikkustel, kuid neil on teatav spektraalne ülekate, mis tuleb elektroonilise kompensatsiooniga korrigeerida. Optimaalsed kompenseerimistasemed saab kindlaks teha analüüsides, kasutades kahe parameetri histogrammi, Stem-Trol Control Cells sisaldavat täisvereproovi, mis on värvitud 7-AAD elujõulisuse eristamise värviga või CXP tarkvara kasutamisel sobivate kompenseerimisreagentidega. Selles analüüsis tehakse kohandusi, tagamaks, et kaksikvärvide kvadrandid ei toimiks värvumist ühegi individuaalse fluorokroomiga.

Elujõulisuse eristamise reagenti 7-AAD (7-aminoaktinomütsiini D) kasutatakse mitteelujõuliste rakkude tuvastamiseks voolu tsütomeetris analüüsis, et võimaldada loendada huvipakkuvaid elujõulisi rakke. Värv võtavad külge surnud rakud (eredad sündmused), mis seejärel elujõulistest rakkudest (negatiivsed sündmused) lüüsimise teel eraldatakse (vt histogrammi 8).

Enne proovide analüüsimist tuleks antikeha reaktiivsuse kontrollimiseks värvida kontrollanalüüs (Stem-Trol-kontrollrakud).

TOIMIMINE

Väljatoodud jõudluse karakteristikud põhinevad Stem-Kiti reagentide kasutamisel voolu tsütomeetril COULTER EPICS XL/XL-MCL tarkvaraga System II. Näiteid FC 500 toimimisest CXP tarkvaraga vt juhendist stemCXP System Guide (stemCXP süsteemijuhend).

Võrdlusvahemike eeldatavad väärtused

Normaalse võrdlusvahemiku määramiseks koguti normaalse täisvere proovid (n = 117) meeste (n = 58) ja naiste (n = 59) populatsioonilt. See uuring tehti välises uuringukohas. Korduskatsed iga proovi jaoks valmistati ette Stem-Kiti reagentipakendi infolehe järgi. CD45+, CD34+ ja CD34% väärtuste saamiseks tehti manuaalne lüüsimine ja analüüs.

Statistiline analüüs näitab kogutud andmete mitte-gaussi jaotust. Nende leidude põhjal kasutati andmete analüüsimiseks mitteparameetrilist (robustset) lähenemist. Saadi CD45+, CD34+ ja CD34% väärtused. Väärtused on CD45+ ja CD34+ jaoks toodud absoluutarvudena (rakke/μl) ja leukotsüütide koguarvu (CD34%) jaoks protsentuaalselt, nagu näidatud alltoodud tabelis.

Normaalne täisveri: võrdlusvahemikud

Manuaalne meetod (robustne analüüs)	n	CD45+ (rakud/μl)				CD34+ (rakud/μl)				CD34+ (%)			
		Min	Max	Keskmine	SH	Min	Max	Keskmine	SH	Min	Max	Keskmine	SH
Käsitsi	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0.50	6.50	2.36	1.14	0.015	0.600	0.052	0.056

Need väärtused on mõeldud üksnes näitlikena. Iga laboratoorium peaks kindlaks määrama oma oodatavad vahemikud kohaliku tavapäraste doonorite populatsiooni alusel.

Lineaarsus

Kõigile 10 seeriana lahjendatud 2 tüüpi (CD34+ sisaldavatele perifeerse täisvere ja värske mobiliseeritud perifeerse täisvere) proovidele tehti kordusmõõtmised. CD34+ HPC kontsentratsioonide jaoks saadi dünaamiline vahemik 0 kuni 2000 rakku/μl ja madal tundlikkusvahemik 0 kuni 150 rakku/μl. Proovid valmistati ette Stem-Kiti reagentipakendi infolehe järgi ja analüüsiti voolu tsütomeetriga COULTER EPICS XL/XL-MCL. Väärtused avaldatakse absoluutarvudena (rakke/μl). Tulemusi analüüsiti lineaarse regressioonanalüüsi tingimustel oodatud vs saadud absoluutarvude jaoks kohta endogeensete CD34+ rakkude paralleelsete proovide keskmiste põhjal. Vt järgmisi tabeleid.

CD34+ HPC absoluutarvude graafikutel olevate regressioonijoonte kallakud näitavad lineaarsuse matemaatilist mõõdet. Seda toetab minimaalne võimalik analüüsi kallutatus, mida kinnitavad analüüsi y-katkestused. Oodatud absoluutarvude korrelatsioon saadud absoluutarvudega on kõrge.

Lisatud CD34+-ga täisvere tulemused

Vt graafikut lisast.

Perifeerse (mobiliseeritud) vere tulemused

Vt graafikut lisast.

Meetodi täpsus (tabelid) (Oodatud vs saadud tulemused)

Meetodi täpsus on määratletud ühtivusastmega oodatud ja saadud tulemuste vahel nii manuaalse kui automaatse lüüsimis- ja analüüsimetodi korral. Värskele normaalsele perifeersele täisverele lisati puhastatud CD34+ rakke kontsentratsioonini 1875 rakku/ μ l. Rakkude arvud kinnitati Malassez'i libiseva hematsütomeetriga ja lahjendati seeriade kaupa erinevatele kontsentratsioonidele. Duplitseeritud mõõtmiste oodatud ja saadud keskmisi tulemusi võrreldakse automaatse ja manuaalse lüüsimis- ja analüüsimetodi kasutamisel ja iga lahjendustaseme kohta. Katkestuse katsetamine tõusu ja ordinaatide suhtes ei näita statistilist erinevust automaatse lüüsimise ja analüüsi ning oodatud tulemuste vahel ega ka manuaalse lüüsimise ja analüüsi ning oodatud tulemuste vahel.

Meetodi täpsus – CD34+ (%)

Vt graafikut lisast.

Meetodi täpsus – CD34+ absoluutarv (rakke/ μ l)

Vt graafikut lisast.

Meetodi täpsus – leukotsüüte kokku – CD45+ (rakke/ μ l)

Vt graafikut lisast.

Meetodi täpsus (automatiseeritud tulemused võrrelduna käsitsi tulemustega)

Täpsuseastet automaatse ja manuaalse meetodi vahel stemONE'i süsteemil kontrolliti neljas välises uuringukohas, kasutades värsket perifeerset täisverd ja värsket või sulatatud afereesi, nabanööri verd ja luuüdi proove. Usaldusintervallid (CI) arvutati 95% piirväärtustega.

Värske perifeerse täisvere (n = 59 kolmest kohast), värsket afereesiainet (n = 51 kolmest kohast), värsket nabanööri verd (n = 29 kahest kohast), värsket luuüdi (n = 33 kahest kohast), sulatatud afereesiainet (n = 23 ühest kohast), sulatatud nabanööri verd (n = 31 kahest kohast) ja sulatatud luuüdi (n = 20 ühest kohast) proovid valmistati ette Stem-Kiti reagentpakendi infolehe järgi ja analüüsiti voolu tsütomeetritel COULTER EPICS XL/XL-MCL. CD45+, CD34+ ja CD34% väärtuste saamiseks tehti automaatne ja manuaalne lüüsimine ja analüüs.

Meetodite täpsus (joonised)

Värsket perifeerse täisvere proovid (n = 59)

Vt graafikut lisast.

Värsked afereesiained (n = 51)

Vt graafikut lisast.

Värsked nabaväädivere proovid (n = 29)

Vt graafikut lisast.

Värsked luuüdi proovid (n = 33)

Vt graafikut lisast.

Sulatatud afereesiproovid (n = 23)

Vt graafikut lisast.

Sulatatud nabaväädivere proovid (n = 31)

Vt graafikut lisast.

Sulatatud luuüdi proovid (n = 20)

Vt graafikut lisast.

Täpsus

Laboritevaheline täpsus

Uuringud tehti ühes kliinilises asutuses kolme kasutaja poolt, kes kõik kasutasid erinevat voolu tsütomeetrit. Tuvastati kolm CD34+ dünaamilist vahemikku (0–2000 rakku/μl) esindavat proovi:

Madal vahemik:	värske mobiliseeritud perifeerne veri
Keskmine vahemik:	afereesiaine
Kõrge vahemik	afereesiaine

Need proovid jaotati kolmeks osaks, igale kasutajale anti üks osa iga taseme (madal, keskmine, kõrge) kohta. Igast osast valmistati proovid (n = 10) Stem-Kiti reagentide pakendi infolehe järgi. Iga kasutaja tegi analüüsi voolu tsütomeetril EPICS XL, kasutades automaatset ja manuaalset lüüsimist ja analüüsi CD45+, CD34+ ja CD34% väärtuste saamiseks. Väärtused avaldatakse leukotsüütide üldarvu protsendina (%) ja rakkude absoluutarvuna (rakke/μl).

Laboritevahelise täpsuse uuringu tulemused on taseme järgi toodud järgmistes tabelites. CD45+ ja CD34+ absoluutarvude jaoks saadud väärtused ja CD34 protsendid näitasid keskmiste, standardhälvete ja variatsioonikordajate põhjal väikest varieeruvust.

Vt graafikut lisast.

Laborisisene täpsus

Analüüsi dünaamilist vahemikku katvad proovid saadi, kasutades värsket perifeerset täisverd, värsket luuüdi ning värsket ja külmutatud afereesiainet ja nabanööri verd neljast välisest uuringukohast. Kümme proovi igast ainest valmistati ette Stem-Kiti reagentide pakendi infolehe juhiste järgi ja analüüsiti voolu tsütomeetritega COULTER EPICS XL/XL-MCL, kasutades CD45+, CD34+ ja CD34% väärtuste saamiseks manuaalset lüüsimist ja analüüsi.

Järgmistes tabelites toodud CD45+, CD34+ ja CD34% väärtused näitavad, et nende mõõtmiste keskmiste, standardhälvete ja variatsioonikordajate põhjal otsustades on analüüsimeetod reprodutseeritav. LISAS toodud andmetabelid näitavad analüüsi laboritevahelist täpsust.

Vt graafikut lisast.

PIIRANGUD

Piirangutest automaatmeetodi kasutamisel lugege stemCXP süsteemi tarkvaraga kaasas olevat stemCXP System Guide (stemCXP süsteemi juhendit).

- Värvitud ja lüüsitud proove tuleb hoida jääl ja analüüsida voolutsütomeetril jaotises „Töödeldud proovi stabiilsus“ toodud teabe kohaselt, sest muidu võivad tulemused osutuda ekslikeks.
- Ärge lahjendage ega külmutage reagente, samuti ärge mõõtke välja nende kogust. Kasutage ainult selliselt, nagu need on pakendatud.
- Reagentid on mõeldud vaid voolutsütomeetriliseks kasutamiseks.
- Sulatage külmutatud proovid korralikult, et tagada optimaalne värvimine.
- Kõik punalibled ei pruugi järgmiste seisundite korral lüüsuda: tuumaga punaliblede olemasolu, ebanormaalne valkude kontsentratsioon või hemoglobiinopaatiad. See võib põhjustada tegelikust väiksemaid CD34% valetulemusi, sest lüüsimata vere punalibled loetakse leukotsüütideks. See ei tohiks mõjutada CD34+ ja CD45+ absoluutarve.
- Teatud patsientide puhul võivad ilmuda eriprobleemid tingituna teatud rakupopulatsioonide muutunud või väga väikesest arvust.
- Voolutsütomeetria teel saadud tulemused võivad olla vigased, kui lüüsid on valesti seadistatud.
- Stem-Kiti reagentid on välja töötatud kasutamiseks elujõulisuse eristamise reagentiga 7-AAD, et teha kindlaks elujõulised HPC-rakud. Kui teie laboris kasutatakse teistsugust elujõulisuse kindlaksmääramise meetodit, järgige üldisi häid laboritavasid ja oma labori kvaliteedikontrolli protseduure, et tagada saadud tulemuste kvaliteet.

KAUBAMÄRGID

Beckman Coulter, stiliseeritud logo ning selles juhendis nimetatud ettevõtte Beckman Coulter toote- ja teenusemärgid on ettevõtte Beckman Coulter, Inc. kaubamärgid või registreeritud kaubamärgid Ameerika Ühendriikides ja teistes riikides.

LISATEAVE

www.beckmancoulter.com

Sümboli tähis

Sümbolite mõisted on kättesaadavad veebilehel beckman.com/techdocs (dokument nr B60062)

Reactivi Stem-Kit

REF IM3630 50 de teste

Pentru diagnosticare *in vitro*

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Reactivii Stem-Kit constau dintr-un reactiv de anticorpi monoclonali murini cu fluorescență în două culori (FITC, PE), un control isoclonic murin cu fluorescență în două culori (FITC, PE), un reactiv pentru determinarea numărului absolut, un reactiv de testare a viabilității celulare și un agent de lizare. Este destinat „utilizării pentru diagnosticale in vitro” pentru identificarea și enumerarea simultană a procentajelor de populații celulare CD45+ și CD45+ CD34+ dual-pozitive și a numerelor absolute în eșantioane biologice prin citometrie în flux. Eșantioanele biologice includ sânge integral periferic normal sau mobilizat proaspăt și sânge din cordonul ombilical, măduva osoasă și produse de afereză proaspete sau congelate. Măsurătorile de populații celulare pot fi obținute utilizându-se o metodă automată sau o metodă manuală pentru gating și analiză.

Consultați prospectul pentru reactivii Stem-Kit Reagents pentru instrucțiuni complete dacă utilizați metoda manuală. Consultați documentul stemCXP System Guide (Ghid pentru sistemul stemCXP) furnizat împreună cu kitul de software stemCXP 2.0 și stemCXP versiunea 2.0, WIN 7 pentru instrucțiuni complete de utilizare a metodei automate.

REZUMAT

Celule progenitoare hematopoietice (HPC)

Reactivii Stem-Kit sunt concepuți pentru identificarea celulelor progenitoare hematopoietice (HPC) umane folosindu-se următoarele criterii: „Celulele CD34+ veritabile (a) exprimă antigenul CD34, (b) exprimă antigenul CD45 cu caracteristica de intensitate a colorării a celulelor blastice (adică sunt ușor detectabile, însă la niveluri inferioare comparativ cu limfocitele și monocitele) și (c) prezintă caracteristicile de dispersie a luminii ale celulelor blastice – la unghi mic în direcție perpendiculară și la unghi mic spre intermediar în direcția înainte” (1). Excluderea CD34+ HPC moarte din enumerarea CD34+ HPC viabile se realizează prin utilizarea colorantului pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD (2).

CD34

Antigenul CD34 este o familie de glicoproteine monocatenare transmembranare de tipul I glicosilate diferențiat (3, 4, 5). Acest antigen este exprimat pe aproape toate celulele precursorare hematopoietice, inclusiv celulele stem multipotente. Epitopii de CD34 au fost împărțiți în trei clase pe baza sensibilității la neuraminidază și la glicoproteaza de *Pasteurella haemolytica* (6). Anticorpul monoclonal (mAb) CD34 utilizat în reactivii Stem-Kit se numește 581. Acesta recunoaște în mod specific un epitop de clasa III a moleculei CD34 (7) așa cum este definit de modelele de clivaj enzimatic (6, 8). Acest anticorp monoclonal 581 a fost atribuit CD34 la 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al 5-lea grup de lucru HLDA privind antigenele de diferențiere a leucocitelor umane), organizat la Boston, Massachusetts, SUA, în 1993 (7).

CD45

Anticorpul CD45 recunoaște membrii familiei CD45 de antigene panleucocitare cu mase moleculare de 180, 190, 210 și 220 kD (9, 10, 11). Mai este cunoscut și sub denumirea de antigen comun leucocitar (LCA). Antigenul CD45 este exprimat pe fiecare tip de celule hematopoietice, cu excepția eritrocitelor mature și a progenitoarelor lor imediate (11, 12). Nu a fost detectat în țesuturile hematopoietice nediferențiate (12, 13, 14, 15). mAb CD45 utilizat în reactivii Stem-Kit se numește J33. Acest anticorp a fost atribuit CD45 la 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (Al 3-lea grup de lucru HLDA privind antigenele de diferențiere a leucocitelor umane), organizat la Oxford, Anglia, în 1986 (16).

7-AAD

Colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-aminoactinomicină D (7-AAD) este un analog al actinomicinei D care conține un grup amino substituit la poziția 7 a cromoforului. Colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD se intercalează între bazele de citozină și guanină ale ADN-ului (15). Actinomicinele sunt compuși biologic activi care conțin un cromofor 2-amino-4,6-dimetil-fenoxazonă-3 și două pentapeptide ciclice (17). Actinomicinele formează complexi stabili cu acidul dezoxiribonucleic (ADN) dublu-catenar, însă nu și cu acidul ribonucleic (ARN) dublu-catenar și nici cu hibridi ADN-ARN sau cu ADN ori ARN monocatenar (15, 18).

Proprietățile spectrale ale colorantului pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD fac ca această moleculă să fie deosebit de adecvată pentru analiza de citometrie în flux (17). Absorbția maximă a complexului 7-AAD/ADN este situată în regiunea spectrală a culorii verzi și, prin urmare, este potrivită pentru citometru echipat cu un laser cu argon (lungime de undă de excitație de 488 nm) (15). Emisia fluorescentă în roșu profund a colorantului pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD (635–675 nm) face ca utilizarea acestei sonde să fie mai ușoară în combinație cu anticorpi conjugați cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) și ficoeritrină (PE), deoarece, spre deosebire de iodura de propidiu (PI), complexul 7-AAD/ADN prezintă o suprapunere spectrală minimală cu FITC și PE (17).

Celulele apoptotice, celulele necrotice și/sau celulele deteriorate sunt surse de interferență în analiza celulelor viabile prin citometrie în flux. Celulele neviabile vor fi evaluate și discriminate prin focalizarea pe colorarea 7-AAD-pozitivă atunci când celulele viabile rămân necolorate (negative) (19).

Sisteme de citometrie în flux

Sistemele de citometrie în flux (FC500) aplică principiile citometriei în flux pentru analizarea eșantioanelor biologice în scopul identificării diverselor populații de celule determinate de anticorpii monoclonali și fluorocromii specifici utilizați. Prezentul test utilizează pentru analizarea probelor sisteme de citometrie în flux FC500 echipate cu software pentru sistemul CXP.

PRINCIPIU

Acest test depinde de capacitatea unui anticorp monoclonal de a se lega de suprafața celulelor care exprimă determinanți antigenici discreți. Reactivul CD45-FITC/CD34-PE din reactivii Stem-Kit este o combinație de doi anticorpi monoclonali murini; fiecare este conjugat la un anumit fluorocrom și specific pentru alt antigen de suprafață celulară. Colorarea specifică a suprafeței celulare se realizează prin incubarea probelor duplicate ale unui eșantion biologic cu reactivul CD45-FITC/CD34-PE în două culori.

Un test suplimentar pentru aceeași probă este colorat cu reactivul CD45-FITC/IsoClonic Control-PE pentru verificarea legării nespecifice a anticorpului monoclonal CD34-PE. Colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD, un colorant de acid nucleic care se leagă la perechile de bază accesibile (ADN celular), este utilizat pentru diferențierea celulelor viabile de cele neviabile. Eritrocitele din fiecare probă sunt lizate cu soluție de lizare NH₄Cl preparată la concentrație 1X. Se adaugă Stem-Count Fluorospheres sau Flow-Count Fluorospheres (reactivul pentru numere absolute) și celulele rămase sunt analizate prin citometrie în flux. Controlul procesului și controlul calității pentru test sunt asigurate de instrument și reactivi pentru controlul calității probelor: Flow-Check Fluorospheres, Flow-Set Fluorospheres, reactivi de compensare adecvați și celule Stem-Trol Control Cells.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

O cronologie a rapoartelor științifice privind celulele progenitoare hematopoietice (HPC) arată că studiile timpurii s-au bazat pentru cuantificare pe numerele de celule nucleate. Studiile ulterioare implicând teste de unități formatoare de colonii (CFU) au furnizat aproximări brute ale populațiilor de celule progenitoare. Cu timpul, testele CFU au fost urmate de descoperirea moleculei de suprafață celulară CD34. Molecula CD34 s-a dovedit a fi prezentă pe suprafața celulelor hematopoietice timpurii și a celulelor formatoare de colonii hematopoietice din măduva osoasă și din sângele periferic (20). Ulterior, au fost dezvoltați și utilizați în citometria în flux anticorpi monoclonali direcționați împotriva moleculei CD34. În prezent, determinările de exprimare a moleculei CD34 prin citometrie în flux sunt larg acceptate ca mijloc de evaluare a celulelor progenitoare și stem hematopoietice.

În măduva osoasă a indivizilor normali, între 1% și 3% dintre celulele care exprimă antigenul CD34 sunt capabile să reconstituie hematopoieza multidendentă pe termen lung (3, 20). În sângele periferic al indivizilor normali, mai puțin de 0,1% dintre celulele circulante exprimă antigenul CD34 (1, 21). Utilizarea reactivilor Stem-Kit asigură o metodă simplă, rapidă și sensibilă de citometrie în flux pentru enumerarea progenitoarelor hematopoietice și a celulelor stem din sângele periferic, produsele de leucafereză, măduva osoasă și sângele din cordonul ombilical.

CONȚINUTUL REACTIVILOR

Reactivii Stem-Kit conțin următoarele:

- Reactiv CD45-FITC/CD34-PE (45/34) – 1 flacon.
- Reactiv CD45-FITC/IsoClonic Control-PE (45/CTRL) – 1 flacon.
- Fluorosfere Stem-Count – 1 flacon.
- Colorant pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD – 1 flacon.
- Soluție de lizare NH₄Cl 10X – 2 flacoane.

1. Acești reactivi trebuie utilizați ca set așa cum sunt furnizați în kit.

Fluorosferele Flow-Count, care sunt echivalente cu fluorosferele Stem-Count, pot fi utilizate pentru determinarea numărului absolut dacă se utilizează concentrația specifică de testare.

2. CD45-FITC/CD34-PE este un reactiv în două culori gata de folosire furnizat în 2,2 ml de ser fiziologic tamponat cu fosfat (PBS) conținând 2 mg/ml de albumină serică bovină (BSA) și 0,1% azidă de sodiu drept conservant.
3. CD45-FITC/IsoClonic Control-PE este un reactiv în două culori gata de folosire furnizat în 1,2 ml de PBS conținând 2 mg/ml de BSA și 0,1% azidă de sodiu drept conservant. Reactivul CD45-FITC/IsoClonic Control-PE este un amestec de anticorpi monoclonali 581 neconjugați sau conjugați cu PE (identici CD34). Acest amestec acționează ca un control izomorfologic adecvat pentru verificarea legării nespecifice a mAb CD34-PE pe fiecare probă specifică.

OBSERVAȚIE: Reactivii CD45-FITC/CD34-PE și CD45-FITC/IsoClonic Control-PE nu trebuie separați. Atunci când se efectuează testele și controalele, trebuie avut grijă ca ambii reactivi să aibă același număr de lot pe eticheta flaconului.

Rezumatul caracteristicilor anticorpilor

Specificitate	CD45	CD34
Clonă	J33	581
Hibridom	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Imunogen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Catenă Ig	IgG1, lanțuri ușoare κ	IgG1, lanțuri ușoare κ
Specie	Șoarece	Șoarece
Conjugare	Izotiocianat de fluoresceină (FITC)	R-ficoeritrină (PE)
Raport molar	5–8 moli FITC/mol Ig	0,5–1,5 moli PE/mol Ig

Specificitate	CD45	CD34
Lungime de undă de excitare	488 nM (albastru-verde)	488 nM (albastru-verde)
Emisie fluorescentă	504–541 nm (mai ales verde)	568–590 nm (mai ales portocaliu)

- Fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count constau din microsfere fluorescente din polistiren de 10 µm (diametru nominal) în 20 ml de mediu de suspensie apos conținând un surfactant și 1% formaldehidă. Fiecare fluorosferă conține un colorant cu un interval de emisie fluorescentă cuprins între 525 nm și 700 nm atunci când este excitat la 488 nm. Concentrația testată de fluorosfere Stem-Count sau Flow-Count (fluorosfere/µl) este derivată din analize replicate multiple efectuate pe un analizor de dimensiuni ale particulelor COULTER. Valoarea specifică a lotului este precizată pe eticheta flaconului.
- Colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD este furnizat în 99% ser fiziologic tamponat cu fosfat (PBS: 0,01 mol de fosfat de sodiu, 0,145 mol de clorură de sodiu, pH 7,2) cu 1% dimetilsulfoxid (DMSO).
- Soluția de lizare NH₄Cl este furnizată la concentrație 10X în flacoane de 20 ml. Soluția conține un amestec de clorură de amoniu (NH₄Cl), bicarbonat de potasiu (KHCO₂) și acid etilendiaminotetraacetic (EDTA) disodic.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

- Preparatele de anticorpi monoclonali conțin 0,1% azidă de sodiu. Azida de sodiu, în condiții acide, produce acid hidrazoic, care este un compus extrem de toxic. Eliminarea în sisteme de canalizare trebuie să fie însoțită de cantități mari de apă curentă pentru evitarea acumulărilor periculoase în conductele metalice și eventualele explozii.
- Eșantioanele, probele și toate materialele care vin în contact cu ele trebuie manipulate ca și când ar fi capabile să transmită infecții și trebuie eliminate respectându-se măsurile de precauție corecte.
- Nu pipetați niciodată folosind gura și evitați contactul probelor sau reactivilor cu pielea sau membranele mucoase.
- Nu utilizați reactivii după data de expirare de pe eticheta flaconului.
- Fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count conțin 1% formaldehidă. Evitați contactul cu pielea și ochii, deoarece formaldehida poate cauza efecte ireversibile asupra acestor țesuturi. Nu inhalați vapori. Purtați echipament de siguranță adecvat, cum ar fi mănuși și ochelari de protecție.
- Nu expuneți reactivii Stem-Kit la lumină puternică sau căldură în timpul păstrării sau utilizării.
- Evitați evaporarea și scurgerea fluorosferelor Stem-Count sau Flow-Count; altfel pot fi generate rezultate eronate. Închideți ermetic flacoanele după utilizare și depozitați-le în poziție verticală.
- Înainte de utilizare, asigurați-vă că fluorosferele sunt complet resuspendate. Evitați amestecarea în exces pentru a limita formarea bulelor de aer. Nu pipetați bule de aer; în caz contrar, pot apărea rezultate eronate.
- Utilizați o pipetă calibrată (de preferat o pipetă cu deplasare pozitivă sau repetoare) pentru dozarea probelor și a fluorosferelor Stem-Count sau Flow-Count; altfel, pot fi generate rezultate eronate.
- Utilizați tehnici de pipetare recomandate de către producătorul pipetei pentru a asigura pipetarea corectă și precisă a probelor și a fluorosferelor Stem-Count sau Flow-Count; altfel pot fi generate rezultate eronate.
- Probele colorate și lizate trebuie depozitate pe gheață și analizate pe citometrul de flux conform informațiilor din secțiunea „Stabilitatea probei procesate”; în caz contrar, pot fi generate rezultate eronate.
- Asigurați-vă că sunt numărate cel puțin 1000 de fluorosfere Stem-Count sau Flow-Count; în caz contrar, conversia automată a rezultatelor la un număr absolut nu va avea loc.
- Fiecare lot de fluorosfere Stem-Count sau Flow-Count are o concentrație specifică de fluorosfere. Asigurați-vă că utilizați concentrația de test corectă atunci când determinați rezultatele pentru valori absolute.
- Metodele de preparare care necesită un pas de spălare nu trebuie utilizate din cauza unei pierderi necunoscute de celule.
- Duratele sau temperaturile de incubare sau mixare altele decât cele specificate pot genera rezultate eronate.
- Colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD conține 0,005% 7-AAD. 7-AAD pur este un potențial cancerigen. Deși acest compus este foarte diluat, vă recomandăm să evitați contactul acestuia cu pielea și ochii și să purtați mănuși și îmbrăcăminte protecție adecvate, precum și protecții pentru ochi/și față corespunzătoare.
- Colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD conține 1% dimetilsulfoxid (DMSO). DMSO pur este o substanță iritantă. Deși acest compus este diluat, vă recomandăm să evitați contactul acestuia cu pielea și ochii și să purtați mănuși și îmbrăcăminte de protecție adecvate, precum și protecții pentru ochi/și față corespunzătoare.
- Fiind un cromofor, 7-AAD este sensibil la lumină. Păstrați colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD în recipientul de ambalare din carton pentru a evita expunerea continuă la lumină în timpul păstrării.
- Minimizați expunerea la lumină a probelor amestecate în timpul incubării.
- Folosiți bunele practici de laborator generale la manipularea reactivilor.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Microsfere fluorescente
Stem-Count

PERICOL



H316

H317

H350

P201

P280

P308+P313

P333+P313

P362+P364

Provoacă iritații cutanate ușoare.
Poate produce o reacție alergică la nivelul pielii.
Poate cauza cancer.
Obțineți instrucțiuni speciale înainte de utilizare.
Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.
ÎN CAZ DE expunere sau posibilitate de expunere: solicitați sfat medical/îngrijire medicală.
În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: solicitați sfat medical sau îngrijire medicală.
Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare.
Formaldehidă 0,5 - 1,0%
amestec de:
5-cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 247-500-7] și 2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 220-239-6](3:1) < 0,05%

Colorant viabilitate 7-AAD

ATENȚIE

H316

P332+P313

Provoacă iritații cutanate ușoare.
În caz de iritare a pielii: solicitați sfat medical/îngrijire medicală.
Dimetilsulfoxid 0,5 - 2%



Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs

CONDIȚII DE PĂSTRARE ȘI STABILITATE

Reactivul sigilat este stabil până la data expirării înscrisă pe flacon atunci când este păstrat la 2–8°C în absența luminii. Nu utilizați după data expirării. Nu congelați. Reactivii Stem-Kit sunt stabili timp de 30 de zile de la deschiderea flaconului de fluorosfere Stem-Count sau Flow-Count. Flacoanele deschise trebuie închise la loc imediat după utilizare și păstrate la 2–8°C în absența luminii. NU formați părți alicote de fluorosfere Stem-Count sau Flow-Count din flaconul original.

IMPORTANT: În cazul scurgerii de fluorosfere Stem-Count sau Flow-Count, există riscul generării unor rezultate eronate. Odată deschise, flacoanele de fluorosfere Stem-Count sau Flow-Count trebuie păstrate în poziție verticală pentru a se preveni posibilitatea de scurgere. Reactivii la care se observă urme de scurgere nu trebuie folosiți.

Dovadă de deteriorare

Semne de deteriorare poate apărea în următoarele situații:

Reactivi Stem-Kit, exceptând fluorosfere Stem-Count

- O modificare a aspectului normal, așa cum este enumerat mai jos

Reactiv	Aspect normal
CD45-FITC / CD34-PE	Lichid transparent, ușor roz
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Lichid de la transparent la ușor roz
Colorant viabilitate 7-AAD	Lichid transparent, ușor roz spre roșu
Soluția de lizare NH ₄ CL	Lichid transparent, incolor

Stem-Count Fluorospheres

- Apariția, în timpul achiziției, a unor populațiilor fluorescente secundare conținând mai mult de 20% din populația totală de fluorosfere.
- O variație majoră a valorilor pentru numerele de celule sau probe.

IMPORTANT: Reactivii nu trebuie utilizați dacă există semne de deteriorare, deoarece pot fi obținute rezultate incorecte. Dacă există semne de deteriorare, contactați reprezentantul local Beckman Coulter.

Prepararea reactivului

1. Reactivii în două culori CD45-FITC/CD34-PE și CD45-FITC/IsoClonic Control-PE se utilizează direct din flacoane, fără nicio diluție.
2. Fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count se utilizează direct din flacon, fără nicio diluare. La prima deschidere, trebuie îndepărtată toată folia de aluminiu termosudată din partea de sus a flaconului. Sunt necesare amestecări corecte. La prima manipulare, la începutul zilei, a flaconului de fluorosfere Stem-Count sau Flow-Count, omogenizați-l prin turbionare timp de 3–5 secunde.

Înainte de pipetare, agitați ușor flaconul răsturnându-l de 3–5 ori.

După omogenizarea inițială prin turbionare la începutul zilei, readuceți flaconul cu fluorosfere la 2–8°C până la utilizare.

Evitați evaporarea și scurgerea închizând ermetic flaconul după utilizare.

3. Colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD se utilizează direct din flacon fără nici o diluare.
4. Trebuie preparată zilnic o soluție de lizare 1X NH₄Cl: adăugați nouă volume de apă deionizată la un volum de soluție de lizare NH₄Cl de concentrație 10X. Nu refrigerați. La sfârșitul zilei, aruncați soluția de lizare NH₄Cl 1X neutilizată.

Aduceți toți reactivii la temperatura camerei (18–25°C) înainte de utilizare.

MANIPULAREA SPECIMENELOR

Cerințe pentru eșantioane

Rezumat privind manipularea specimenelor:

Tipul de specimen	Metoda de gating	Temperatură de depozitare	Vechimea specimenului
Afereză	Algoritm	2–8°C	24 de ore
	Manual	2–8°C	24 de ore
Măduvă osoasă	Algoritm	2–8°C	24 de ore
	Manual	2–8°C	24 de ore
Sânge din cordonul ombilical	Algoritm	18–25°C	24 de ore
	Manual	18–25°C	24 de ore
Sânge integral normal	Algoritm	18–25°C	20 de ore
	Manual	18–25°C	20 de ore
Sânge integral mobilizat	Algoritm	18–25°C	20 de ore
	Manual	18–25°C	20 de ore

1. Eșantioanele biologice includ sânge integral periferic normal sau mobilizat proaspăt și produse de afereză proaspete sau congelate, sânge din cordonul ombilical și din măduva osoasă.
2. Celulele progenitoare hematopoietice (HPC) manipulate sau purificate pot fi analizate numai cu metoda de gating manual.
3. Colectați produsele de afereză, speciemenle de sânge periferic, speciemenle de sânge din cordonul ombilical sau speciemenle de măduvă osoasă în condiții aseptice, într-o eprubetă de colectare de sânge vidată sterilă cu anticoagulant ACD formula A sau K3 EDTA.
4. Speciemenle de sânge integral și de sânge integral mobilizat colectate în eprubete cu anticoagulant pot fi depozitate timp de până la 20 de ore la temperatura camerei (18–25°C) înainte de colorare.
5. Speciemenle de sânge din cordonul ombilical colectate în eprubete cu anticoagulant pot fi depozitate timp de până la 24 de ore la temperatura camerei (18–25°C) înainte de colorare.
6. Produsele de afereză colectate și speciemenle de măduvă osoasă pot fi depozitate până la 24 de ore la 2–8°C înainte de colorare.
7. Înainte de prepararea probei, asigurați-vă că aveți o concentrație de leucocite (WBC) care nu depășește 30 x 10⁹ celule WBC/l. Dacă este necesar, diluați proba cu HBSS sau un echivalent pentru a ajunge la o valoare medie de 15 x 10⁹ celule WBC/l. Înregistrați factorul de diluție pentru calcularea numărului absolut final de HPC.
8. Concentrațiile scăzute de proteine pot cauza aglutinarea fluorosferelor Stem-Count sau Flow-Count și generarea unor valori eronate mari ale numerelor absolute de celule. Diluarea eșantioanelor cu o concentrație scăzută de proteine trebuie realizată utilizându-se un tampon îmbogățit în proteine.
9. Toate eșantioanele trebuie procesate cu reactivi Stem-Kit incluzând colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD.

Procedura pentru procesarea eșantioanelor

Efectuați teste duplicate urmând „The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry” („Liniile directoare ISHAGE pentru determinări celulare CD34+ prin citometrie în flux”) (1).

OBSERVAȚIE: Pentru procesarea celulelor de control Stem-Trol, consultați prospectul din ambalajul produsului Celule de control Stem-Trol pentru instrucțiuni complete dacă utilizați metoda manuală. Consultați stemONE System Guide (Ghidul de utilizare a sistemului stemONE) furnizat împreună cu software-ul sistemului stemONE și stemCXP System Guide (Ghidul de utilizare a sistemului stemCXP) furnizat împreună cu software-ul sistemului stemCXP pentru instrucțiuni complete la utilizarea metodei de analiză automate.

1. Pentru fiecare probă de eșantion etichetați trei eprubete după cum urmează:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipetați 20 µl de reactiv CD45-FITC/CD34-PE în eprubetele 45/34/7-AAD #1 și 45/34/7-AAD #2.
3. Pipetați 20 µl de reactiv CD45-FITC/IsoClonic Control-PE în eprubeta 45/CTRL/7-AAD.
4. Pipetați în toate eprubetele 20 µl de colorant pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD.

IMPORTANT: Există risc de lizare incompletă dacă rămâne specimen de sânge pe partea de sus sau pe lateralul eprubetei de test. Aveți grijă când pipetați pentru a împiedica sângele să atingă partea de sus sau lateralul eprubetei de test. Curățați eprubeta cu un tampon din bumbac, dacă este cazul, pentru a elimina toate urmele de specimen de sânge din partea de sus sau lateralul eprubetei de test.

5. Utilizând o pipetă cu deplasare pozitivă sau o pipetă repetoare, pipetați 100 µl din proba de la pacient în eprubetă.
6. Omogenizați imediat eprubeta prin turbionare timp de 5 secunde.
7. Incubați la temperatura camerei (18–25°C) timp de 20 de minute, departe de lumină.
8. După incubare, adăugați 2 ml de soluție de lizare preparată NH₄Cl 1X preparată în eprubetă și omogenizați imediat prin turbionare timp de 5 secunde.

OBSERVAȚIE: Pentru detalii despre pregătirea soluției de lizare, consultați secțiunea 7.2 de mai sus, intitulată PREPARAREA REACTIVULUI.

IMPORTANT: Există riscul unor rezultate eronate dacă sunt pipetate bule de aer. Amestecarea excesivă a fluorosferelor Stem-Count sau Flow-Count poate crea bule de aer. Nu amestecați excesiv fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count și nu pipetați bule de aer în eprubete.

9. Incubați la temperatura camerei timp de 10 minute, departe de lumină.
10. Amestecați ușor fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count răsturnând fiola de 3–5 ori înainte de utilizare.
11. Înainte de achiziție și imediat după pasul 9, utilizând o pipetă cu deplasare pozitivă sau repetoare, pipetați 100 µl de microsferă fluorescente Stem-Count sau Flow-Count în fiecare dintre cele trei eprubete.
12. Omogenizați imediat fiecare eprubetă prin turbionare timp de 5 secunde.

OBSERVAȚIE: Pentru detalii despre pregătirea soluției de lizare, consultați secțiunea 7.2 de mai sus, intitulată PREPARAREA REACTIVULUI.

Rezumatul colorării eșantioanelor

Reactivi/Probe	45/34/7-AAD #1	Etichetă eprubetă de testare 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µl	20 µl	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µl
Colorant viabilitate 7-AAD	20 µl	20 µl	20 µl
Specimen	100 µl	100 µl	100 µl
Omogenizare prin turbionare – incubați la temperatura camerei timp de 20 de minute. Feriți de lumină.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 ml	2 ml	2 ml
Omogenizare prin turbionare – incubați la temperatura camerei timp de 10 minute. Feriți de lumină.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µl	100 µl	100 µl
Agitator cu turbionare			

Reactivi/Probe	45/34/7-AAD #1	Etichetă eprubetă de testare 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
Produsele de afereză colectate, probele de sânge din cordonul ombilical și probele de măduvă osoasă, nu trebuie lăsate mai mult de 60 de minute pe gheață înainte de efectuarea achiziției.			
Probele de sângele integral și de sânge integral mobilizat nu trebuie lăsate mai mult de 45 de minute pe gheață înainte de efectuarea achiziției.			
Analizați imediat probele decongelate.			
A se feri de lumină			

Stabilitatea probei procesate:

- După adăugarea microsferelor fluorescente Stem-Count sau Flow-Count, produsele de afereză colectate, probele de sânge din cordonul ombilical și probele de măduvă osoasă nu trebuie lăsate mai mult de 60 de minute pe gheață înainte de efectuarea achiziției.
- După adăugarea microsferelor fluorescente Stem-Count sau Flow-Count, probele de sângele integral și de sânge integral mobilizat nu trebuie lăsate mai mult de 45 de minute pe gheață înainte de efectuarea achiziției.
- În cazul probei congelate, achiziția trebuie efectuată imediat după adăugarea microsferelor fluorescente Stem-Count sau Flow-Count.
- Probele procesate trebuie depozitate pe gheață într-un loc protejat împotriva expunerii la lumină, iar expunerea RT trebuie să se limiteze cât mai mult posibil în timpul achiziției.

CONȚINUT

Azida de sodiu folosită drept conservant poate forma compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați buletinul informativ al NIOSH: Explosive Azide Hazard (Azidă cu risc de explozie) (08/16/76).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Apă deionizată.
- Soluție salină echilibrată Hank (HBSS) sau echivalentă
- Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
- Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
- Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
- CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
- QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
- Ca o alternativă la Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF 7547053)
- Baie de apă cu gheață
- Eprubete de testare din plastic (12 x 75 mm)
- Pipetă repetoare calibrată (20 µl, 100 µl, 2 ml) și vârfuri sau pipete cu deplasare pozitivă (20 µl, 100 µl, 2 ml) și vârfuri calibrate
- Pipetă calibrată standard (20 µl, 100 µl, 2 ml) și vârfuri.
- Agitator pentru omogenizare.
- Cronometru.
- Citometru de flux.
- Kit software stemCXP 2.0, stemCXP versiunea 2.0, WIN 7, NUMAI pentru analiza automată a probelor pe sisteme de citometrie în flux FC 500 echipate cu software-ul CXP (versiunea 2.0).

REZULTATE

Configurarea protocolului de analiză

Citometrul de flux trebuie să fie echipat pentru detectarea dispersiei perpendiculare, dispersiei pe direcția înainte și a patru canale de fluorescență. Pentru canalul FL3 (pentru monitorizarea fluorosferelor Stem-Count sau Flow-Count), folosiți un filtru de trecere bandă de 620 nm. Pentru canalul FL4 (pentru monitorizarea colorantului pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD), folosiți un filtru de trecere cu lungimea de 675 nm.

Asigurați-vă că citometrul în flux este aliniat și standardizat corect pentru intensitatea fluorescenței.

Asigurați-vă că citometrul în flux este reglat corect pentru compensarea fluorescenței.

OBSERVAȚIE: Pentru analiza eșantioanelor, toate pozițiile regiunilor sunt aproximative până la sfârșitul achiziției eprubetei 45/34/7-AAD #1. Regiunile sunt optimizate în conformitate cu următorul protocol și apoi NU sunt ajustate pentru a doua și a treia eprubetă din panel.

Pentru analiza eșantioanelor trebuie urmate o serie de 8 histograme și o schemă de gating (vezi mai jos). Aceeași serie de 8 histograme și aceeași schemă de gating trebuie urmate și atunci când se utilizează celule de control CD34+. Regiunile A, B, C și D (consultați secțiunea „Crearea regiunilor” pentru definirea regiunii) vor fi adaptate pentru a include clusterul de caracteristici pentru celule de control CD34+.

Crearea histogramei

Creăți histogramele astfel:

1. Creăți Histograma 1 ca FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter (Dispersie perpendiculară).
2. Creăți Histograma 2 ca FL2 CD34-PE vs. Side Scatter (Dispersie perpendiculară).
3. Creăți Histograma 3 ca FL1 CD45-FITC vs. Side Scatter (Dispersie perpendiculară).
4. Creăți Histograma 4 ca Forward Scatter (Dispersie pe direcția înainte) vs. Side Scatter (Dispersie perpendiculară).
5. Creăți Histograma 5 ca FL1 CD45-FITC vs. FL2 CD34-PE.
6. Creăți Histograma 6 ca Forward Scatter (Dispersie pe direcția înainte) vs. Side Scatter (Dispersie perpendiculară).
7. Creăți Histograma 7 ca Timp vs. Fluorofere Stem-Count sau Flow-Count FL3.
8. Creăți Histograma 8 pentru colorant pentru teste de viabilitate celulară FL4 7-AAD vs. Side Scatter (Dispersie perpendiculară).

Histogramele de la 1 la 4 sunt destinate caracterizării CD34+ HPC, un proces care poate fi întârziat până în etapa de analiză. Aceste patru prime histograme sunt configurate conform ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (Instrucțiunile ISHAGE pentru determinarea celulelor CD34+ prin citometrie de flux) (1, 2). Histogramele 5 până la 7 sunt destinate monitorizării parametrilor importanți în etapa de achiziție. Aceștia includ discriminatorul Forward Scatter (Dispersie pe direcția înainte), numărul de evenimente CD45+ care trebuie colectate și acumularea valorilor unice corecte de fluorofere.

Histograma 8 este destinată diferențierii și analizării evenimentelor viabile de cele neviabile.

Crearea regiunii

Creăți regiunile astfel:

1. Histograma 1 – Creăți o regiune A rectiliniară pe Histograma 1 pentru a include toate leucocitele CD45+ și eliminați trombocitele, resturile de eritrocite și agregatele.
2. Histograma 1 – Creăți o Regiune E amorfă pe Histograma 1 pentru includerea limfocitelor (CD45bright, dispersie perpendiculară scăzută).
3. Histograma 2 – Creăți o Regiune B rectiliniară în Histograma 2 pentru a include toate evenimentele CD34+. Setați un contor de oprire pentru 75.000 de evenimente (evenimente CD45+) pentru Histograma 2.
4. Histograma 3 – Creăți o Regiune C amorfă în Histograma 3 pentru a include toate evenimentele CD45dim din cluster.
5. Histograma 4 – Creăți o Regiune D amorfă în Histograma 4 pentru a include toate evenimentele din cluster cu dispersie perpendiculară intermediară și dispersie pe direcția înainte intermediară până la ridicată.
6. Histograma 5 – Creăți o regiune Quadstat I în Histograma 5 pentru a verifica limita inferioară a expresiei CD45 la evenimentele CD34+.
7. Histograma 5 – Creăți o Regiune H amorfă în Histograma 5 pentru a înconjura toate fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count, inclusiv duplicatele. Regiunea H ar trebui să fie în colțul din dreapta-sus al Histogramei 5.

OBSERVAȚIE: Asigurați-vă că Regiunea H este trasată ca regiune AMORPHOUS (Amorfă).

8. Histograma 5 – Creăți o Regiune K rectiliniară K (numită „listgate –”) în Histograma 5. Set ați limitele Regiunii K la prima decadă logaritmică a histogramei biparametrice. Această Regiune K permite eliminarea evenimentelor negative duble în cursul achiziției pentru analizarea a 75.000 de evenimente CD45+ relevante.
9. Histograma 6 – Copiați regiunea D din Histograma 4 ca Regiune F în Histograma 6.
10. Histograma 7 – Creăți o Regiune G rectiliniară în Histograma 7 pentru a include numai valorile singulare pentru fluorofere Stem-Count sau Flow-Count. Regiunea G poate fi etichetată drept „CAL” pentru a permite calcularea automată a numerelor absolute de CD34+ HPC (consultați manualul instrumentului pentru detalii suplimentare).
11. Histograma 8 – Creăți o Regiune J rectiliniară în Histograma 8 pentru a include leucocite viabile (evenimente negative de colorant pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD).

Crearea porții

Creați porțile astfel:

1. Histograma 1 – Atribuiți valoarea „J” Histogramei 1 pentru a se afișa toate evenimentele viabile. Dacă nu se utilizează 7-AAD, atribuiți regiunea „H” Histogramei 1 pentru a se afișa toate evenimentele, exclusiv toate fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count, inclusiv duplicatele.
2. Histograma 2 – Atribuiți „AJ” („A” dacă nu se utilizează 7-AAD) Histogramei 2 pentru a se afișa evenimente CD34+ viabile (totale dacă nu se utilizează 7-AAD).
3. Histograma 3 – Atribuiți „A” și „B” și „J” („A” și „B” dacă nu se utilizează 7-AAD) Histogramei 3 pentru a se afișa toate evenimentele CD45+/CD34+ viabile (totale dacă nu se utilizează 7-AAD).
4. Histograma 4 – Atribuiți „A” și „B” și „C” și „J” („A” și „B” și „C” dacă nu se utilizează 7-AAD) Histogramei 4 pentru a se afișa evenimentele în cluster CD45+/CD34+ viabile (totale dacă nu se utilizează 7-AAD) cu Side Scatter (Dispersie perpendiculară) redusă și excluderea trombocitelor și a resturilor celulare. Evenimentele din Regiunea ABCDJ reprezintă CD34+ HPC viabile reale.
5. Histograma 5 – Anulați porțile pentru a afișa toate evenimentele.
6. Histograma 6 – Atribuiți „EJ” („E” dacă nu se utilizează 7-AAD) Histogramei 6 pentru a se afișa limfocite viabile (totale dacă nu se utilizează 7-AAD) ca verificare vizuală pe discriminator.
7. Histograma 7 – Atribuiți valoarea „H” histogramei 7 pentru a se afișa toate fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count, inclusiv duplicatele.
8. Histograma 8 – Atribuiți valoarea „A” Histogramei 8 pentru a se afișa toate evenimentele CD45+.

Setarea citometriei în flux

1. Verificați că citometrul în flux este corect aliniat și optimizat pentru dispersia luminii și intensitățile fluorescenței pentru detectoarele FL1, FL2, FL3 și FL4 în conformitate cu indicațiile producătorului și ale laboratorului. Verificați compensarea culorii: aceasta trebuie să fie configurată pentru operare standard. Consultați manualul instrumentului pentru instrucțiuni suplimentare.
2. Omogenizați eprubetele de test timp de 5 secunde.
3. Realizați achiziția datelor pe citometrul în flux. Trebuie analizate minimum 75.000 de evenimente CD45+.
4. Pentru analiza eșantioanelor: ajustați discriminatorul și regiunile analizând eprubeta de testare 45/34/7-AAD #1. Salvați protocolul și analizați eprubetele 45/34/7-AAD #2 și 45/CTRL/7-AAD fără nicio altă ajustare.

Exemplu de analiză

Histogramele prezentate în ANEXĂ sunt afișate în ordine crescătoare, așa cum sunt afișate în protocol.

Calcularea CD34+ HPC pentru eșantion

Numărul de CD34+ HPC se calculează ca media rezultatelor statistice din Regiunea D pentru cele două probe replicate (adică 45/34/7-AAD #1 și 45/34/7-AAD #2).

Rezultatele pentru CD34+ HPC sunt considerate valide dacă rezultatele obținute de reactivul CD45-FITC/IsoClonic Control-PE sunt mai mici cu 10% decât rezultatele pentru CD34+ HPC.

1. Calculați media rezultatelor obținute din eprubetele 45/34/7-AAD #1 și 45/34/7-AAD #2 pentru fiecare eșantion (adică media rezultatele statistice imprimate pentru Regiunea D). Numărul de CD34+ HPC se poate încadra în limita a 10% din media pentru probele duplicate. Pentru a se valida rezultatele, valoarea obținută cu eprubeta cu control 45/CTRL/7-AAD trebuie să reprezinte mai puțin de 10% din valoarea medie obținută din eprubetele de testare

NOTE:

Dacă media pentru numărul absolut obținut pentru CD34+ HPC dublate este în afara intervalului acceptat (adică este mai mare de 10%), determinați dacă pipetarea a fost efectuată corect, mai ales pentru fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count. Verificați vizual rapoartele citometrului în flux și calitatea proceselor de colorare și de lizare din eprubetele de testare. Verificați modul în care au fost stabilite limitele regiunii.

Dacă valoarea obținută cu 45/CTRL/7-AAD este în afara intervalului de valori acceptate (adică este mai mare de 10% din media pentru numărul absolut obținut pentru duplicat), determinați dacă pipetarea a fost efectuată corect, mai ales pentru fluorosferele Stem-Count sau Flow-Count. Verificați vizual rapoartele citometrului în flux și calitatea proceselor de colorare și de lizare din eprubetele de testare. Verificați modul în care au fost stabilite limitele regiunii.

Dacă este necesar, repetați pasul de achiziție cu adăugare unei eprubete BLANK după prima eprubetă duplicată 45/34/7-AAD #1 și #2 și înainte de eprubeta 45/CTRL/7-AAD. Dacă este necesar, repetați întreaga preparare cu eprubete de testare noi adăugând eprubeta BLANK. Achiziționați și analizați atât noua, cât și precedentă serie de eprubete. Comparați cele două rezultate. Dacă nu sunt în acord, contactați reprezentantul local Beckman Coulter.

2. Dacă proba a fost diluată, rezultatul obținut mai sus TREBUIE multiplicat cu factorul de diluție (Dil) adecvat. Rezultatul final obținut este numărul absolut de CD34+ HPC (celule/ μ l).

$$\text{Numărul absolut de CD34+ HPC (celule/\mu l)} = \text{Rezultatul imprimat pentru numărul absolut de CD34+ HPC (celule/\mu l)} \times \text{Dil}$$

3. Pentru pachetele de afereză, numărul total de CD34+ HPC per pachet poate fi calculat din următoarea formulă:

$$\text{Număr total de CD34+ HPC per pachet} = \text{Număr absolut de CD34+ HPC (celule/\mu l)} \times 10^6 \times \text{Volum pachet (l)}$$

Unde:

4. Pentru procentajul de CD34+ HPC în calculul valorii leucocitelor CD45+, consultați următoarea formulă:

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Număr absolut de CD34+ HPC (celule/\mu l)} \quad \text{(adică rezultatele imprimate pentru Regiunea D)}}{\text{Număr absolut de leucocite CD45+ (celule/\mu l)} \quad \text{(adică rezultatele imprimate pentru Regiunea A)}} \times 100$$

CONTROLUL CALITĂȚII

Asigurați-vă că citometrul în flux este aliniat corect în conformitate cu recomandările producătorului listate în manualele instrumentului. Intensitățile-țintă au fost stabilite pentru optimizarea setărilor instrumentului pentru dispersia luminii și fluorescenței pentru analiza probelor colorate cu reactivul cu anticorpi monoclonali CD45-FITC/CD34-PE și reactivul CD45-FITC/Isoclonic Control-PE.

Fluorocromii de izotiocianat de fluoresceină (FITC), ficoeritrina (PE) și colorantul 7-aminoactinomycină D (7-AAD) emit la lungimi de undă diferite, însă prezintă o anumită suprapunere spectrală care trebuie corectată prin compensare electronică. Nivelurile optime de compensare pot fi stabilite prin analiza, într-o histogramă biparametrică, a unei probe de sânge integral îmbogățite cu celule Stem-Trol Control Cells colorate cu colorant pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD și reactivi de compensare adecvați atunci când se utilizează software-ul CXP. În această analiză se efectuează ajustări pentru a se asigura faptul că nu se produce nicio colorare în cadranul în două culori cu niciun fluorocrom individual.

Colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD (7-aminoactinomycină) este utilizat pentru identificarea celulelor neviabile prin analiză de citometrie în flux și enumerarea celulelor de interes viabile. Colorantul este preluat de celulele moarte (evenimente „bright”), care, apoi, sunt excluse dintre celulele viabile (evenimente „negative”) prin gating (vezi Histograma 8).

Înainte de analizarea probelor trebuie colorat un control testat (celule de control Stem-Trol) pentru verificarea reactivității anticorpilor.

PERFORMANȚĂ

Caracteristicile de performanță furnizate se bazează pe reactivi Stem-Kit utilizați cu un citometru în flux COULTER EPICS XL/XL-MCL cu software System II. Pentru exemple de performanță pe un instrument FC 500 cu software CXP, consultați stemCXP System Guide (Ghidul de utilizare a sistemului stemCXP).

Valori preconizate pentru intervalele de referință

Eșantioanele de sânge integral (n = 117) au fost colectate de la o populație de bărbați (n = 58) și de femei (n = 59) pentru stabilirea unui interval de referință normal. Studiul a fost efectuat într-o locație de evaluare externă. testele replicate pentru fiecare eșantion au fost preparate în conformitate cu prospectul din ambalajul reactivilor Stem-Kit. Au fost efectuate gating-ul și analiza manuale pentru obținerea valorilor CD45+, CD34+ și CD34%.

Analiza statistică sugerează o distribuție non-gaussiană a datelor colectate. Pe baza acestor constatări, pentru analizarea datelor a fost utilizată o abordare (robustă) neparametrică. Au fost obținute valorile CD45+, CD34+ și CD34%. Valorile sunt exprimate în termeni de numere absolute (celule/ μ l) pentru CD45+ și CD34+ și de procentaj din numărul total de leucocite (CD34%). așa cum este arătat în tabelul de mai jos.

Sânge integral normal: intervale de referință

Metodă manuală (analiză robustă)	n	CD45+ (celule/ μ l)				CD34+ (celule/ μ l)				CD34+ (%)			
		Min.	Max	Medie	SD (deviație standard)	Min.	Max	Medie	SD (deviație standard)	Min.	Max	Medie	SD (deviație standard)
Manual	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Aceste valori au doar caracter exemplificativ. Fiecare laborator trebuie să stabilească propriile valori așteptate de la populația locală de donatori normali.

Liniaritate

Măsurătorile replicate au fost efectuate la fiecare 10 diluții seriale pentru 2 tipuri de probe: sânge integral periferic îmbogățit cu CD34+ și sânge integral periferic mobilizat proaspăt. Pentru concentrațiile de CD34+ HPC au fost realizate un interval dinamic de 0–2000 celule/ μ l și un interval de sensibilitate de bază de 0–150 celule/ μ l. Probele au fost preparate pe baza prospectului pentru reactivii Stem-Kit și au fost analizate pe un citometru în flux COULTER EPICS XL/XL-MCL. Valorile sunt exprimate ca numere absolute (celule/ μ l). Rezultatele au fost analizate în termeni de analiză cu regresie liniară pentru numerele absolute așteptate vs. recuperate pentru media celulelor replicate minus numărul de celule CD34+ endogene. Consultați următoarele tabele.

Pantele liniilor de regresie furnizate cu graficele pentru numerele absolute de CD34+ HPC arată măsura matematică a liniarității. Acest lucru este susținut de polarizarea minimă potențială a testelor, așa cum este evidențiat de intersecțiile cu axa y pentru analize. Numerele absolute așteptate demonstrează o corelație ridicată cu numerele absolute recuperate.

Rezultate pentru sânge integral îmbogățit cu CD34+

Consultați Anexa pentru grafic.

Rezultate pentru sânge periferic (mobilizat)

Consultați Anexa pentru grafic.

Acuratețea metodei (tabele)

(Rezultate așteptate vs. recuperate)

Acuratețea metodei este definită ca gradul de acord dintre rezultatele așteptate și cele recuperate pentru ambele metode, manuală și automată, de analiză și de gating. Sângele integral periferic normal proaspăt a fost îmbogățit cu celule CD34+ purificate până la un nivel de 1875 celule/ μ l. Numerele de celule au fost confirmate de un hemocitometru cu lamă Malassez și diluate serial la concentrații diferite. Rezultatele așteptate sunt comparate cu cele recuperate pentru media măsurătorilor duplicate utilizându-se gating și analiză automate și manuale pentru fiecare nivel de diluție. Testarea pentru pantă și ordonate la de intersecție nu demonstrează nicio diferență statistică între și gating-ul și analiza automate și rezultatele așteptate și nici între gating-ul și analiza manuale și rezultatele așteptate.

Acuratețea metodei - CD34+ (%)

Consultați Anexa pentru grafic.

Acuratețea metodei - Număr absolut de CD34+ (celule/ μ l)

Consultați Anexa pentru grafic.

Acuratețea metodei - Total de leucocite - CD45+ (celule/ μ l)

Consultați Anexa pentru grafic.

Precizia metodei (rezultate automate vs. manuale)

Gradul de acuratețe între metodele manuală și automată al sistemului stemONE a fost studiat la patru locații de evaluare externe utilizându-se sânge integral periferic proaspăt și produse de afereză proaspete sau decongelate, sânge din cordonul ombilical și eșantioane de măduvă osoasă. Intervalele de încredere (CI) au fost calculate cu limite de 95%.

Eșantioanele de sânge integral periferic proaspăt (n = 59 din trei locații), produse de afereză proaspete (n = 51 din trei locații), sânge proaspăt din cordonul ombilical (n = 29 din două locații), măduvă osoasă proaspătă (n = 33 din două locații), produse de afereză congelate (n = 23 dintr-o singură locație), sânge din cordonul ombilical congelat (n = 31 din două locații) și măduvă osoasă congelată (n = 20 dintr-o singură locație) au fost preparate pe baza prospectului pentru reactivii Stem-Kit și au fost analizate pe citometre în flux COULTER EPICS XL/XL-MCL. S-au efectuat gating și analiză automate și manuale pentru obținerea valorilor CD45+, CD34+ și CD34%.

Acuratețea metodelor (figuri)

Eșantioane de sânge integral periferic proaspăt (n = 59)

Consultați Anexa pentru grafic.

Eșantioane de afereză proaspete (n = 51)

Consultați Anexa pentru grafic.

Eșantioane de sânge din cordonul ombilical proaspăt (n = 29)

Consultați Anexa pentru grafic.

Eșantioane din măduvă osoasă proaspătă (n = 33)

Consultați Anexa pentru grafic.

Eșantioane de afereză decongelate (n = 23)

Consultați Anexa pentru grafic.

Eșantioane congelate de sânge din cordonul ombilical (n = 31)

Consultați Anexa pentru grafic.

Eșantioane de măduvă osoasă decongelată (n = 20)

Consultați Anexa pentru grafic.

Precizie

Precizia interlaboratoare

Studiile au fost efectuate într-o singură unitate clinică de către trei operatori, fiecare folosind alt citometru de flux. Au fost identificate trei eșantioane reprezentând domeniul dinamic CD34+ (0–2000 celule/ μ l):

Interval inferior:	sânge periferic mobilizat, proaspăt
Interval median:	produs de afereză
Interval superior:	produs de afereză

Aceste eșantioane au fost divizate în trei părți alicote și fiecare dintre cei trei operatori i-a fost furnizată câte o parte alicotă corespunzătoare fiecărui nivel (inferior, median, superior). Probele (n = 10) au fost pregătite din fiecare parte alicotă în conformitate cu prospectul din ambalajul reactivilor Stem-Kit. Fiecare operator a efectuat analiza pe un citometru în flux EPICS XL utilizând metodele automată și manuală de gating și analiză pentru obținerea valorilor CD45+, CD34+ și CD34%. Valorile sunt exprimate ca procentaj (%) din numărul total de leucocite și ca numere absolute (celule/ μ l).

Rezultatele studiului privind precizia interlaboratoare, pe niveluri, sunt prezentate în tabelele următoare. Valorile obținute pentru numerele absolute de CD45+ și CD34+ și procentajele de CD34 au indicat o variație mică, după cum reiese din mediile, deviațiile standard și coeficienții de variație pentru măsurătorile replicate.

Consultați Anexa pentru grafic.

Precizia intralaborator

Eșantioanele care acoperă intervalul dinamic al testului au fost obținute prin utilizarea de sânge integral periferic proaspăt, măduvă osoasă proaspătă și sânge din cordonul ombilical și produse de afereză proaspete și decongelate de la patru locații de evaluare externe. Au fost preparate zece probe în conformitate cu prospectul din ambalajul reactivilor Stem-Kit și aceste probe au fost analizate pe citometre în flux COULTER EPICS XL/XL-MCL utilizându-se gating-ul și analiza automate pentru obținerea valorilor CD45+, CD34+ și CD34%.

Valorile pentru CD45+, CD34+ și CD34% furnizate în următoarele tabele demonstrează că metoda de analiză este evidențiată de mediile, deviațiile standard și coeficienții de variație pentru aceste măsurători. Tabelele de date arătate în ANEXĂ demonstrează precizia interlaboratoare a testării.

Consultați Anexa pentru grafic.

LIMITĂRI

Consultați documentul stemCXP System Guide (Ghid pentru sistemul stemCXP) furnizat împreună cu software-ul sistemului stemCXP pentru limitări la utilizarea metodei automate.

- Probele colorate și lizate trebuie depozitate pe gheață și analizate pe citometrul de flux conform informațiilor din secțiunea „Stabilitatea probei procesate”; în caz contrar, pot fi generate rezultate eronate.
- Nu diluați, nu divizați în părți alicote și nu congelați reactivii. Utilizați numai în forma ambalată.
- Reactivii sunt numai pentru utilizare la citometrie în flux.
- Decongelați corect eșantioanele congelate pentru a asigura o colorare optimă.
- Este posibil ca nu toate eritrocitele să fie lizate în următoarele condiții: prezență de eritrocite nucleate, concentrație anormală de proteine sau hemoglobinopatii. Acest lucru poate determina rezultate CD34% fals diminuate din cauza eritrocitelor nelizate numărate drept leucocite. Numerele absolute de CD34+ și CD45+ nu ar trebui să fie afectate.
- Anumiți pacienți pot prezenta probleme speciale din cauza numerelor alterate sau foarte scăzute ale anumitor populații celulare.
- Dacă porțile sunt setate incorect, este posibil ca rezultatele citometriei în flux să fie eronate.
- Reactivii Stem-Kit sunt destinați utilizării cu colorant pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD pentru determinarea celulelor viabile HPC. Dacă laboratorul dvs. utilizează o metodă alternativă de determinare a viabilității, urmați bunele practici generale de laborator și procedurile de control al calității ale laboratorului pentru a asigura calitatea rezultatelor raportate.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

INFORMAȚII SUPLIMENTARE

www.beckmancoulter.com

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

Stem-Kit reaģenti

REF IM3630 50 testi

In vitro diagnostikas lietošanai

PAREDZĒTĀ LIETOŠANA

Stem-Kit reaģenti sastāv no divu krāsu fluorescējoša (FITC, PE) peles monoklonālās antivielas reaģenta, divu krāsu peles fluorescējošas (FITC, PE) izokloniskās kontroles, absolūtā skaita reaģenta, šūnu dzīvotspējas reaģenta un līzēšanas reaģenta. Tas ir paredzēts „Lietošanai in vitro diagnostikā” vienlaicīgajai CD45+ identificēšanai un uzskaitīšanai un duāli pozitīvu CD45+ CD34+ šūnu populācijas procentuālā daudzuma un absolūtā skaita noteikšanai bioloģiskajos paraugos, izmantojot plūsmas citometriju. Bioloģiskie paraugi ietver svaigas normālas vai mobilizētas perifērās pilnasinis un svaigus vai atkausētus aferēzes produktus, nabas saites asinis un kaulu smadzenes. Šūnu populāciju mērījumus var iegūt, atsiļāšanai un analizēšanai izmantojot automātisko metodi vai manuālo metodi.

Ja tiek izmantota manuālā metode, pilnīgus norādījumus skatiet šajā Stem-Kit reaģentu iepakojuma ieliktņī. Ja izmantojat automatizēto metodi, pilnīgus norādījumus skatiet rokasgrāmatā stemCXP System Guide (sistēmas stemCXP rokasgrāmata), kas iekļauta programmatūras stemCXP 2.0 komplektā un programmatūras stemCXP versijā 2.0, WIN 7.

KOPSAVILKUMS

Hematopoētiskas progenitora šūnas (HPC)

Stem-Kit reaģenti ir izstrādāti, lai identificētu cilvēka hematopoētiskas progenitora šūnas (HPC), izmantojot šādus kritērijus: „Īstas CD34+ šūnas (a) ekspresē CD34 antigēnu, (b) ekspresē CD45 antigēnu ar krāsošanas intensitāti, kas raksturīga blastu šūnām (t. i., viegli nosakāmi, bet zemākā līmenī nekā limfocīti un monocīti) un (c) tām ir blastu šūnām raksturīgs zems sānu leņķis un zema līdz vidēja uz priekšu vērsta leņķa gaismas izkliede.”(1). Mirušo CD34+ HPC izslēgšana no dzīvotspējīgu CD34 + HPC uzskaitījuma tiek panākta, izmantojot 7-AAD dzīvotspējas krāsvielu (2).

CD34

CD34 antigēns ir diferencēti glikozilētu I tipa transmembrānas vienas ķēdes glikoproteīnu saime (3, 4, 5). Tas tiek ekspresēts praktiski uz visām hematopoētisko prekursoru šūnām, tostarp uz multipotentajām cilmes šūnām. CD34 epitopi ir iedalīti trīs klasēs, pamatojoties uz jutību pret neiraminidāzi un pret Pasteurella haemolytica glikoproteāzi (6). Stem-Kit reaģentos izmantotā CD34 monoklonālā antiķiela (monoclonal antibody — mAb) tiek saukta par 581. Tā specifiski atpazīst CD34 molekulas III klases epitopu (7), kā definēts ar enzīmu šķelšanas modeļiem (6, 8). Šī 581 monoklonālā antiķiela tika piešķirta CD34 molekulai seminārā 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5. HLDA seminārs saistībā ar cilvēka leikocītu diferencēšanas antiķielām), kas 1993. gadā notika Bostonā, Masačūsetsā, ASV (7).

CD45

CD45 antiķiela atpazīst panleikocītu antigēnu CD45 saimes locekļus ar molekulāro svaru 180, 190, 210 un 220 kD (9, 10, 11). Tā tiek saukta arī par leikocītu kopējo antigēnu (leukocyte common antigen — LCA). CD45 antigēns tiek ekspresēts katram hematopoētisko šūnu tipam, izņemot nobriedušos eritrocītus un to tiešos progenitorus (11, 12). Tas nav konstatēts diferencētos nehematopoētiskos audos (12, 13, 14, 15). Stem-Kit reaģentos izmantotā CD45 monoklonālā antiķiela (mAb) tiek saukta par J33. Tā tika piešķirta CD45 antigēnam seminārā 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3. HLDA seminārs saistībā ar cilvēka leikocītu diferencēšanas antiķielām), kas 1986. gadā notika Oksfordā, Lielbritānijā (16).

7-AAD

7-amino-aktinomicīna D (7-AAD) dzīvotspējas krāsviela ir aktinomicīna D analogs, kas satur aizvietotu aminogrupu hromofora 7. pozīcijā. 7-AAD dzīvotspējas krāsviela interkalē starp DNS citozīna un guanīna bāzi (15). Aktinomicīni ir bioloģiski aktīvi savienojumi, kas satur 2-amino-4, 6-dimetilfenoksazona-3 hromoforu un divus cikliskus pentapeptīdus (17). Aktinomicīni veido stabilus kompleksus ar divslāņu dezoksiribonukleīnskābi (DNS), bet ne ar divslāņu ribonukleīnskābi (RNS), nedz arī ar RNS-DNS hibrīdiem vai ar vienslāņa DNS vai RNS (15, 18).

7-AAD dzīvotspējas krāsviela spektrālās īpašības padara šo molekulu īpaši piemērotu plūsmas citometrijas analīzei (17). 7-AAD/DNA savienojuma maksimālā absorbcija atrodas zaļajā spektrālajā apgabalā un līdz ar to ir piemērota ar argona lāzeru aprīkotam citometram (ar ierosināšanas viļņa garumu 488 nm) (15). 7-AAD dzīvotspējas krāsvielas dziļi sarkanās fluorescences emisija (no 635 līdz 675 nm) padara šīs zondes lietošanu vienkāršāku kombinācijā ar fluoresceīna izotiocianāta (fluorescein isothiocyanate — FITC) un fikoeritrīna (phycoerythrin — PE) konjugētām antiķielām, jo atšķirībā no propīdija jodīda (propidium iodide — PI) 7-AAD/DNA savienojums uzrāda minimālu spektrālo pārklāšanos ar FITC un PE (17).

Apoptiskas, nekrotiskas šūnas un/vai bojātas šūnas izraisa traucējumus dzīvotspējīgu šūnu analizē ar plūsmas citometriju. Dzīvotspējīgās šūnas ir jānovērtē un jāatšķir, koncentrējoties uz 7-AAD-pozitīvu iekrāsošanu, kad dzīvotspējīgās šūnas paliek neiekrāsotas (negatīvas) (19).

Plūsmas citometru sistēmas

Plūsmas citometru sistēmās (FC 500), izmantojot plūsmas citometrijas principus, tiek analizēti bioloģiski paraugi, lai identificētu dažādas šūnu populācijas, ko nosaka izmantotās specifiskās monoklonālās antivielas un fluorohromi. Esošajā testā paraugu analizēšanas nolūkam ir izmantotas plūsmas citometru sistēmas FC 500, kas aprīkotas ar sistēmas programmatūru CXP.

PRINCIPS

Šis tests ir atkarīgs no ir monoklonālās antivielas spējas saistīties ar tādu šūnu virsmu, kas ekspresē diskrētas antigēna determinantes. CD45-FITC/CD34-PE reaģentu Stem-Kit reaģentos veido kombinācija no divām peles monoklonālajām antivielām; katra no tām ir konjugēta ar specifisku fluorohromu un ir specifiska citam šūnu virsmas antigēnam. Specifiskā šūnu virsmas iekrāsošana tiek panākta, bioloģiskā parauga divus eksemplārus inkubējot ar divu krāsu CD45-FITC/CD34-PE reaģentu.

Tā paša parauga papildu tests tiek iekrāsots ar CD45-FITC/IsoClonic Control-PE reaģentu, lai pārbaudītu CD34-PE monoklonālās antivielas nespecifisko saistīšanos. 7-AAD dzīvotspējas krāsviela, nukleīnskābes krāsviela, kas saistās ar pieejamajiem bāzu pāriem (šūnu DNA), tiek izmantota, lai dzīvotspējīgās šūnas atšķirtu no dzīvotnespējīgajām šūnām. Sarkanie asinsķermenīši katrā paraugā tiek lizēti ar NH₄Cl lizēšanas šķīdumu, kurš ir sagatavots 1X. Tiek pievienotas Stem-Count fluorosfēras vai Flow-Count fluorosfēras (absolūtā skaita reaģents), un atlikušās šūnas tiek analizētas ar plūsmas citometriju. Procesa kontroli un kvalitātes kontroli testam nodrošina instrumenta un parauga kvalitātes kontroles reaģenti: Flow-Check fluorosfēras, Flow-Set fluorosfēras, atbilstošie kompensācijas reaģenti un Stem-Trol kontroles šūnas.

KLĪNISKO PIELIETOJUMU PIEMĒRI

Hematopoētisko progenitora šūnu (HPC) zinātnisko ziņojumu hronoloģija rāda, ka agrīnajos pētījumos kvantitatīvajai noteikšanai tika izmantots nukleāro šūnu skaits. Turpmākajos pētījumos, kas ietvēra koloniju veidošanas vienību (CFU) testus, tika noteiktas aptuvenas progenitora šūnu populācijas. Laikietilpīgajām CFU analizēm sekoja šūnu virsmas molekulas CD34 atklāšana. Tika konstatēts, ka CD34 atrodas uz agrīnu hematopoētisku šūnu un hematopoētisku kolonijas veidojošu šūnu virsmas kaulu smadzenēs un perifērajās asinīs (20). Pēc tam tika izstrādātas monoklonālās antivielas pret molekulu CD34, un tās tika izmantotas plūsmas citometrijā. CD34 noteikšana ar plūsmas citometriju tagad ir plaši pieņemta kā līdzeklis, lai novērtētu hematopoētiskas progenitora šūnas un cilmes šūnas.

Normālu indivīdu kaulu smadzenēs 1–3 % šūnu, kas ekspresē CD34 antigēnu, spēj šķīdināt ilgtermiņa daudzceloņu hematopoēzi (3, 20). Normālo indivīdu perifērajās asinīs mazāk nekā 0,1 % cirkulējošu šūnu ekspresē CD34 antigēnu (1, 21). Stem-Kit reaģentu izmantošana nodrošina vienkāršu, ātru un jutīgu plūsmas citometrijas metodi, lai uzskaitītu hematopoētiska progenitora un cilmes šūnas perifērajās asinīs, leikofērēzes produktos, kaulu smadzenēs un nabas saites asinīs.

REAĢENTA SASTĀVS

Stem-Kit reaģenti satur tālāk norādīto.

- CD45-FITC/CD34-PE reaģents (45/34) — 1 flakons.
- CD45-FITC / izokloniskās kontroles PE reaģents (45/CTRL) — 1 flakons.
- Stem-Count fluorosfēras — 1 flakons.
- 7-AAD dzīvotspējas krāsviela — 1 flakons.
- 10X NH₄Cl lizēšanas šķīdums — 2 flakoni.

1. Šie reaģenti ir jāizmanto kopā — piegādātajā komplektā.

Flow-Count fluorosfēras, kas ir līdzvērtīgas Stem-Count fluorosfērām, var izmantot absolūtā skaitļa noteikšanai, ja izmanto specifisko testēto koncentrāciju.

2. CD45-FITC/CD34-PE ir lietošanai gatavs divu krāsu reaģents, kas tiek iegūts 2,2 ml fosfātu buferšķīdumā (PBS), kas satur 2 mg/ml liellopu seruma albumīna (BSA) un 0,1 % nātrija azīdu kā konservantu.
3. CD45-FITC/IsoClonic Control-PE ir lietošanai gatavs divu krāsu reaģents, kurš tiek nodrošināts 1,2 ml fosfātu buferšķīdumā (PBS), kas satur 2 mg/ml liellopu seruma albumīna (BSA) un 0,1 % nātrija azīda, ko izmanto kā konservantu. CD45-FITC/IsoClonic Control-PE reaģents ir nekonjugētas un PE konjugētas (CD34 identiskas) 581 monoklonālās antivielas maisījums. Šis maisījums darbojas kā piemērota, izomorfoloģiska kontrole, lai pārbaudītu CD34-PE mAb nespecifisko sasaisti katram paraugam.

PIEZĪME. CD45-FITC/CD34-PE un CD45-FITC/IsoClonic Control-PE reaģentus nedrīkst atdalīt. Veicot testus un kontroles, ir jānodrošina, lai abiem reaģentiem uz flakona etiķetes būtu vienāds partijas numurs.

Antivielu īpašību kopsavilkums

Specifika	CD45	CD34
Klons	J33	581
Hibridoma	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Imunogēns	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig ķēde	IgG1, κ gaismas ķēdes	IgG1, κ gaismas ķēdes
Suga	Pele	Pele
Konjugācija	Fluoresceīna izotiocianāts (FITC)	R fikoeritrīns (PE)
Molārā attiecība	5–8 moli FITC uz molu Ig	0,5–1,5 moli PE uz molu Ig
Ierosināšanas viļņa garums	488 nM (zili-zaļā krāsā)	488 nM (zili-zaļā krāsā)
Fluorescences emisija	504–541 nm (galvenokārt zaļš)	568–590 nm (galvenokārt oranžs)

4. Stem-Count fluorosfēras un Flow-Count fluorosfēras sastāv no 10 μm (nomināls diametrs) polistirola fluorescējošu mikrosfēru 20 ml ūdens suspensijas vidē, kas satur surfaktantu un 1 % formaldehīda. Katra fluorosfēra satur krāsvielu ar fluorescences emisijas diapazonu 525–700 nm, kad fluorosfēra ierosināta pie 488 nm. Stem-Count fluorosfēru vai Flow-Count fluorosfēru testētā koncentrācija (fluorosfēras/μl) ir atvasināta no vairākkārt atkārtotām analizēm ar COULTER daļiņu lieluma analizatoru. Partijai specifiskā vērtība ir norādīta uz flakona etiķetes.
5. 7-AAD dzīvotspējas krāsviela tiek nodrošināta 99 % fosfātu buferētā fizioloģiskajā šķīdumā (PBS: 0,01 M nātrija fosfāts, 0,145 M nātrija hlorīds, pH 7,2), ar 1 % dimetilsulfoksīda (DMSO).
6. NH₄Cl līzēšanas šķīdums tiek piegādāts kā 10X koncentrēts 20 ml šķīdums. Tas satur amonija hlorīda (NH₄Cl), kālija bikarbonāta (KHCO₃) un dinātrija etilēndiamīntetraacetātskābes (EDTA) maisījumu.

BRĪDINĀJUMI UN PIESARDZĪBAS PASĀKUMI

1. Monoklonālo antivielu preparāti satur 0,1 % nātrija azīda. Nātrija azīds skābā vidē veido hidrazoīdskābi — ļoti toksisku savienojumu. Lai izvairītos no bīstamas uzkrāšanās metāla caurulēs un iespējamiem sprādzieniem, izmešana notekūdeņu sistēmās jāveic līdz ar lielu tekoša ūdens daudzumu.
2. Ar klīniskajiem materiāliem, paraugiem un visiem materiāliem, kas nonāk saskarē ar tiem, jārikojas tā, it kā tie spētu pārnēsāt infekciju, un jāiznīcina ar atbilstošu piesardzību.
3. Nekādā gadījumā nedrīkst pipetēt ar muti, un ir jāizvairās no paraugu vai reaģentu saskaršanās ar ādu vai gļotādu.
4. Nelietojiet reaģentus pēc derīguma termiņa, kas norādīts uz flakona marķējuma.
5. Stem-Count fluorosfēras un Flow-Count fluorosfēras satur 1 % formaldehīda. Jāizvairās no saskares ar ādu un acīm, jo formaldehīds šiem audiem var izraisīt neatgriezeniskas sekas. Nedrīkst ieelpot tvaikus. Jāvālkā piemērots drošības aprīkojums, piemēram, cimdi un acu aizsardzības līdzekļi.
6. Uzglabāšanas vai lietošanas laikā Stem-Kit reaģentus nedrīkst pakļaut spēcīgai gaismai vai karstumam.
7. Nepieļaujiet Stem-Count fluorosfēru un Flow-Count fluorosfēru iztvaikošanu un noplūdi; pretējā gadījumā rezultātos var rasties kļūda. Pēc lietošanas cieši aizskrūvējiet flakonu vāciņus un uzglabājiet vertikālā stāvoklī.
8. Nodrošiniet, ka pirms lietošanas fluorosfēras ir pilnībā atkārtoti suspendētas. Lai samazinātu gaisa burbuļu veidošanos, izvairieties no pārmērīgas maisīšanas. Nepipetējiet gaisa burbuļus, jo vai var rasties kļūdaini rezultāti.
9. Paraugu, Stem-Count fluorosfēru un Flow-Count fluorosfēru dozēšanai izmantojiet kalibrētu pipeti (vēlams pozitīvo maināmo uzgaļu virzulpipeti vai atkārtotas dozēšanas pipeti); pretējā gadījumā rezultātos var rasties kļūda.
10. Izmantojiet pipetes ražotāja ieteikto pipetēšanas tehniku, lai nodrošinātu rūpīgu un precīzu paraugu un Stem-Count fluorosfēru vai Flow-Count fluorosfēru pipetēšanu; pretējā gadījumā rezultātos var rasties kļūda.
11. Iekrāsoti un lizēti paraugi ir jāglabā uz ledu, un tie ir jāanalizē plūsmas citometrā saskaņā ar sadaļā „Apstrādāta parauga stabilitāte” sniegto informāciju, citādi var rasties kļūdaini rezultāti.
12. Jātieks saskaitītām vismaz 1000 Stem-Count fluorosfērām vai Flow-Count fluorosfērām, pretējā gadījumā rezultāti netiks automātiski pārveidoti par absolūtajiem skaitiem.
13. Katrai Stem-Count fluorosfēru vai Flow-Count fluorosfēru partijai ir specifiska fluorosfēru koncentrācija. Ir jānodrošina, ka absolūtā skaita rezultātu noteikšanai tiek lietota pareizā analizējamā koncentrācija.
14. Nelietojiet sagatavošanas metodes, kurās nepieciešama mazgāšana, jo tas var izraisīt nezināmu šūnu skaita zudumu.
15. Izmantojot tādus inkubācijas vai maisīšanas laikus vai temperatūras, kas nav minētas, rezultāti var būt kļūdaini.
16. 7-AAD dzīvotspējas krāsviela satur 0,005 % 7-AAD. Tīrs 7-AAD ir potenciāls kancerogēns. Lai gan šis savienojums ir ļoti atšķaidīts, ieteicams izvairīties no kontakta ar ādu un acīm, kā arī valkāt piemērotu aizsargapģērbu un cimdus un atbilstošu acu/sejas aizsardzību.
17. 7-AAD dzīvotspējas krāsviela satur 1 % dimetilsulfoksīda (DMSO). Tīrs DMSO ir kairinošs. Lai gan šis savienojums ir atšķaidīts, ieteicams izvairīties no saskares ar ādu un acīm, kā arī valkāt piemērotu aizsargapģērbu un cimdus un atbilstošu acu/sejas aizsardzību.
18. Kā hromofors 7-AAD ir jutīgs pret gaismu. Uzglabājiet 7-AAD dzīvotspējas krāsvielu komplekta kartona iepakojuma tvertnē, lai izvairītos no ilgstošas gaismas iedarbības uzglabāšanas laikā.
19. Inkubācijas laikā ir maksimāli jāsamazina gaismas iedarbība uz samaisītajiem paraugiem.
20. Rīkojoties ar reaģentiem, ir jāievēro laba laboratorijas prakse.

KĪMISKO VIELU KLASIFICĒŠANAS UN MARĶĒŠANAS VISPĀRĒJI SASKAŅOTĀS SISTĒMAS BĪSTAMĪBAS KLASIFIKĀCIJA

Stem-Count Fluorospheres

BĪSTAMI





H316
H317
H350
P201

Izraisa nelielu ādas kairinājumu.
Var izraisīt alerģisku ādas reakciju.
Var izraisīt vēzi.
Pirms lietošanas saņemiet speciālas instrukcijas.
Izmantojiet aizsargcimdus, aizsargapģērbu un acu aizsargus/sejas aizsargus.
Ja nokļūst saskarē vai saistīts ar to: lūdziet medicīnu palīdzību.
Ja rodas ādas kairinājums vai izsitumi: lūdziet medicīnu palīdzību.
Novilkt notraipīto apģērbu un pirms atkārtotas lietošanas izmazgāt.
Formaldehīds 0,5 - 1,0 %
reakcijas masa:
5-hlor-2-metil-4-izotiazolīn-3-ons [EK Nr. 247-500-7] un
2-metil-4-izotiazolīn-3-ons [EK Nr. 220-239-6] (3:1) < 0,05 %

P280

P308+P313

P333+P313

P362+P364

7-AAD dzīvotspējas krāsviela

UZMANĪBU
H316
P332+P313

Izraisa nelielu ādas kairinājumu.
Ja rodas ādas kairinājums: lūdziet medicīnu palīdzību.
Dimetilsulfoksīds 0,5 - 2 %



Drošības datu lapa ir pieejama vietnē: techdocs.beckman.com

GLABĀŠANAS NOSACĪJUMI UN STABILITĀTE

Neatvērtā stāvoklī reaģents ir stabils līdz derīguma termiņa beigām, kas norādītas uz flakona, ja to uzglabā 2–8 °C temperatūrā, sargājot no gaismas. Nelietojiet pēc derīguma termiņa beigām. Nedrīkst sasaldēt. Stem-Kit reaģenti ir stabili 30 dienas pēc Stem-Count fluorosfēru vai Flow-Count fluorosfēru flakona atvēršanas. Atvērtie flakoni ir atkārtoti jāaizver tūlīt pēc lietošanas un jāuzglabā 2–8 °C temperatūrā, sargājot no gaismas. NEDRĪKST dalīt Stem-Count fluorosfēras vai Flow-Count fluorosfēras alikvotās no sākotnējā flakona.

SVARĪGI!

Ja rodas Stem-Count fluorosfēru vai Flow-Count fluorosfēru noplūde, pastāv risks, ka rezultāti būs kļūdaini. Pēc atvēršanas Stem-Count fluorosfēras un Flow-Count fluorosfēras jāuzglabā vertikāli, lai novērstu noplūdes iespēju. Reaģentus nedrīkst izmantot, ja tiek novērotas noplūdes pazīmes.

Sadalīšanās pazīmes

Sadalīšanās pazīmes var rasties tālāk norādītajās situācijās.

Stem-Kit reaģenti, izņemot Stem-Count fluorosfēras

- Izmaiņas normālā izskatā, kā norādīts tālāk

Reaģents	Normāls izskats
CD45-FITC / CD34-PE	Dzidrs, gaiši sārts šķidrums
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Dzidrs līdz gaiši sārts šķidrums
7-AAD dzīvotspējas krāsviela	Dzidrs, gaiši sārts līdz sarkanīgs šķidrums
NH ₄ CL līzēšanas šķidrums	Dzidrs, bezkrāsains šķidrums

Stem-Count Fluorospheres

- Iegūšanas laikā to sekundāro fluorescējošo populāciju parādīšanās, kas satur vairāk nekā 20 % no kopējās fluorosfēru populācijas.
- Skaitiem vai paraugiem iegūtās vērtības ir ļoti mainīgas.

SVARĪGI!

Reaģentus nedrīkst izmantot, ja ir sadalīšanās pazīmes, jo var iegūt nepareizus rezultātus. Ja ir sadalīšanās pazīmes, zvaniet vietējam Beckman Coulter pārstāvim.

Reaģenta sagatavošana

- CD45-FITC/CD34-PE un CD45-FITC/IsoClonic Control-PE divkrāsu reaģentus izmanto tieši no flakoniem bez atšķaidīšanas.

2. Stem-Count fluorosfēras vai Flow-Count fluorosfēras izmanto tieši no flakoniem bez atšķaidīšanas. Uzreiz pēc pudeles atvēršanas no tās augšdaļas jānoņem visi alumīnija termiskie blīvējumi. Nepieciešams atbilstoši samaisīt. Kad dienas sākumā flakonu ar Stem-Count fluorosfērām vai Flow-Count fluorosfērām izmanto pirmo reizi, samaisiet ar virpuļveida kustībām 3–5 sekundes.
Pirms pipetējat no flakona, uzmanīgi sajauciet flakona saturu, 3–5 reizes apvēršot flakonu.
Pēc sākotnējās virpuļveida samaisīšanas dienas sākumā fluorosfēru flakons ir jānogādā atpakaļ 2–8 °C temperatūrā, kur tam ir jāatrodas līdz lietošanas brīdim.
Nepieļaujiet iztvaikošanu un noplūdes, pēc lietošanas flakonu cieši aizverot.
3. 7-AAD dzīvotspējas krāsvielu izmanto tieši no flakona bez atšķaidīšanas.
4. 1X NH₄Cl līzēšanas šķīdums ir jāsagatavo katru dienu: deviņas daļas dejonizēta ūdens ir jāpievieno vienai daļai 10X koncentrēta NH₄Cl līzēšanas šķīduma. Nedrīkst atdzesēt. Neizlietotais 1X NH₄Cl līzēšanas šķīdums dienas beigās ir jāizmet.
Pirms lietošanas panāciet, lai visi reaģenti būtu istabas temperatūrā (18–25 °C).

PARAUGU APSTRĀDE

Prasības attiecībā uz paraugiem

Paraugu apstrādes kopsavilkums:

Parauga tips	Sinhronizācijas metode	Glabāšanas temperatūra	Parauga vecums
Aferēze	Algoritms	2–8 °C	24 stundas
	Manuāli	2–8 °C	24 stundas
Kaulu smadzenes	Algoritms	2–8 °C	24 stundas
	Manuāli	2–8 °C	24 stundas
Nabassaites asinis	Algoritms	18–25 °C	24 stundas
	Manuāli	18–25 °C	24 stundas
Normāla pilnasins	Algoritms	18–25 °C	20 stundas
	Manuāli	18–25 °C	20 stundas
Mobilizēta pilnasins	Algoritms	18–25 °C	20 stundas
	Manuāli	18–25 °C	20 stundas

1. Bioloģiskie paraugi ietver svaigas, normālas vai mobilizētas perifērās pilnasinis un svaigus vai atkausētus aferēzes produktus, nabas saites asinis un kaulu smadzenes.
2. Manipulētas vai attīrītas hematopoētiska progenitora šūnas (HPC) var analizēt tikai ar manuālās atsijāšanas metodi.
3. Aseptiski savāciet aferēzes produktus, perifēro asiņu paraugus, nabassaites asins paraugus vai kaulu smadzeņu paraugus sterilā iztukšotā asins paņemšanas mēģenē ar ACD formulas A vai K3 EDTA antikoagulantu.
4. Pilnasiņu un mobilizētus pilnasiņu paraugus, kas savākti antikoagulantu mēģenēs, pirms iekrāsošanas var glabāt līdz 20 stundām istabas temperatūrā (18–25 °C).
5. Pirms iekrāsošanas nabassaites asiņu paraugus, kas savākti antikoagulantu mēģenēs, var glabāt līdz 24 stundām istabas temperatūrā (18–25 °C).
6. Savāktos aferēzes produktus un kaulu smadzeņu paraugus pirms iekrāsošanas var uzglabāt līdz 24 stundām 2–8 °C temperatūrā.
7. Pirms paraugu sagatavošanas pārliecinieties, ka balto asinsķermenīšu (WBC) koncentrācija nav lielāka par 30 x 10⁹ WBC šūnas/l. Ja nepieciešams, paraugu atšķaida ar HBSS vai līdzvērtīgu šķīdumu, lai sasniegtu vidējo vērtību 15 x 10⁹ WBC šūnas/l. Atšķaidījuma koeficientu ieraksta, lai aprēķinātu galīgo HPC absolūto skaitu.
8. Zema olbaltumvielu koncentrācija var novest pie Stem-Count fluorosfēras vai Flow-Count fluorosfēras saķepšanu un dot kļūdaini augstu absolūto šūnu skaitu. Paraugu ar zemu proteīna koncentrāciju atšķaidīšana jāveic, izmantojot ar proteīnu bagātinātu buferšķīdumu.
9. Visiem paraugiem ir jābūt apstrādātiem ar Stem-Kit reaģentiem, tostarp 7-AAD dzīvotspējas krāsvielu.

Paraugu apstrādes procedūra

Veiciet testus dubultā, ievērojot „ISHAGE vadlīnijas CD34+ šūnu noteikšanai ar plūsmas citometriju” (1).

PIEZĪME. Ja izmantojat manuālo metodi, pilnīgu informāciju par Stem-Trol kontroles šūnu apstrādi skatiet Stem-Trol kontroles šūnu lietošanas instrukcijā. Ja izmantojat automatizētās analīzes metodi, pilnīgus norādījumus skatiet stemONE sistēmas pamācībā, kas ir nodrošināta kopā ar stemONE sistēmas programmatūru, vai stemCXP sistēmas pamācībā, kas ir nodrošināta kopā ar stemCXP sistēmas programmatūru.

1. Katram parauga paraugam trīs stobriņus markē, kā norādīts tālāk.
- 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2

- 45/CTRL/7-AAD
2. Pipetējiet 20 µl reaģenta CD45-FITC/CD34-PE stobriņos: 45/34/7-AAD Nr. 1 un 45/34/7-AAD Nr. 2.
 3. 20 µl CD45-FITC/IsoClonic Control-PE reaģenta ar pipeti ievietojiet mēģenē: 45/CTRL/7-AAD.
 4. Visās mēģenēs ar pipeti ievietojiet 20 µl 7-AAD dzīvotspējas krāsvielas.

SVARĪGI! Nepilnīgas līzes risks, ja asins paraugs paliek testa stobriņa augšpusē vai uz testa stobriņa malas. Pipetējot raugieties, lai asins nesaskartos ar testa stobriņa augšpusi vai malu. Ja nepieciešams, notīriet testa stobriņu ar vates tamponu, lai no stobriņa augšpuses vai malas noņemtu visas asins parauga atliekas.

5. Izmantojot pozitīvo maināmo uzgaļu virzulpipeti vai atkārtotas dozēšanas pipeti, pipetējiet stobriņā 100 µl pacienta parauga.
6. Nekavējoties samaisiet stobriņu 5 sekundes.
7. Inkubējiet visus stobriņus istabas temperatūrā (18–25 °C) 20 minūtes, sargājot no gaismas.
8. Pēc inkubēšanas katrai mēģenei ir jāpievieno 2 ml sagatavota 1X NH₄Cl līzēšanas šķīduma un nekavējoties 5 sekundes jāveic virpuļveida maisīšana.

PIEZĪME. Sīkāku informāciju par līzēšanas šķīduma sagatavošanu skatiet iepriekš 7.2. sadaļā „REAĢENTA SAGATAVOŠANA”.

SVARĪGI! Kļūdainu rezultātu risks, ja tiek pipetēti gaisa burbuļi. Pārmērīga Stem-Count fluorosfēru vai Flow-Count fluorosfēru sajaukšana var radīt gaisa burbuļus. Stem-Count fluorosfēras vai Flow-Count fluorosfēras nedrīkst pārmērīgi samaisīt, un paraugu mēģenēs nedrīkst pipetēt gaisa burbuļus.

9. Inkubējiet istabas temperatūrā 10 minūtes, sargājot no gaismas.
10. Stem-Count fluorosfēras vai Flow-Count fluorosfēras ir uzmanīgi jāsamaisa, pirms lietošanas flakonu apgriežot otrādi 3 līdz 5 reizes.
11. Pirms iegūšanas un tūlīt pēc 9. darbības, izmantojot pozitīvo maināmo uzgaļu virzulpipeti vai atkārtotas dozēšanas pipeti, katrā no trim mēģenēm pipetējiet 100 µl Stem-Count fluorosfēru vai Flow-Count fluorosfēru.
12. Katrai mēģenei ir nekavējoties 5 sekundes jāveic virpuļveida maisīšana.

PIEZĪME. Sīkāku informāciju par līzēšanas šķīduma sagatavošanu skatiet iepriekš 7.2. sadaļā „REAĢENTA SAGATAVOŠANA”.

Paraugu iekrāsošanas kopsavilkums

Reaģenti/paraugi	45/34/7-AAD #1	Testa mēģenes etiķete 45/34/7-AAD Nr. 2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µl	20 µl	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µl
7-AAD dzīvotspējas krāsviela	20 µl	20 µl	20 µl
Paraugs	100 µl	100 µl	100 µl
Jāveic virpuļveida maisīšana — jāveic inkubēšana istabas temperatūrā 20 minūtes. Sargājiet no gaismas.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 ml	2 ml	2 ml
Jāveic virpuļveida maisīšana — 10 minūtes jāinkubē istabas temperatūrā. Sargājiet no gaismas.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µl	100 µl	100 µl
Virpuļmikseris			
Attiecībā uz savāktiem aferēzes produktiem, nabassaites asins paraugiem un kaulu smadzeņu paraugiem — pirms iegūšanas negaidiet ilgāk par 60 minūtēm, kamēr tie atrodas uz ledus.			
Attiecībā uz pilnasiņu un mobilizētu pilnasiņu paraugiem — pirms iegūšanas negaidiet ilgāk par 45 minūtēm, kamēr tie atrodas uz ledus.			
Atkausētais paraugs ir jāanalizē nekavējoties.			
Sargājiet no gaismas			

Apstrādāta parauga stabilitāte:

- Attiecībā uz savāktiem aferēzes produktiem, nabassaites asins paraugiem un kaulu smadzeņu paraugiem — pirms iegūšanas, pēc tam, kad ir papildinātas Stem-Count vai Flow-Count fluorosfēras, negaidiet ilgāk par 60 minūtēm, kamēr tie atrodas uz ledus.
- Attiecībā uz pilnasiņu un mobilizētu pilnasiņu paraugiem — pirms iegūšanas, pēc tam kad ir papildinātas Stem-Count vai Flow-Count fluorosfēras, negaidiet ilgāk par 45 minūtēm, kamēr tie atrodas uz ledus.

- Sasaldēta parauga iegūšana jāveic uzreiz pēc Stem-Count vai Flow-Count fluorosfēru papildināšanas.
- Apstrādātie paraugi ir jāglabā uz ledus, kas ir pasargāts no gaismas iedarbības, un iegūšanas laikā ir maksimāli jāierobežo pakļaušana telpas temperatūras iedarbībai.

SATURS

Nātrija azīda konservants var izveidot sprādzienbīstamus savienojumus metāla notekcaurulēs. Skatīt NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (NIOSH biļetens: Azīdu sprādzienbīstamība) (16.8.76.).

Lai nepieļautu iespējamo azīda savienojumu uzkrāšanos, pēc neatšķaidītā reaģenta izmešanas izskalojiet kanalizācijas caurules ar ūdeni. Nātrija azīda izmešana ir jāveic saskaņā ar atbilstošajiem vietējiem noteikumiem.

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NEIETILPST KOMPLEKTĀ

1. Dejonizēts ūdens.
2. Henksa sabalansētais sāļu šķīdums (HBSS) vai līdzvērtīgs šķīdums
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Kā alternatīva Stem-Count fluorosfērām: Flow-Count fluorosfēras (REF 7547053)
9. Kūstoša ledus vanna
10. Plastmasas testa mēģenes (12 x 75 mm)
11. Kalibrēta atkārtotas dozēšanas pipete (20 µl, 100 µl, 2 ml) un uzgaļi vai kalibrētas pozitīvās maināmo uzgaļu virzuļpipetes (20 µl, 100 µl, 2 ml) un uzgaļi
12. Kalibrēta standarta pipete (20 µl, 100 µl, 2 ml) un ieteikumi.
13. Vortex maisītājs.
14. Taimeris.
15. Plūsmas citometrs.
16. Programmatūras stemCXP 2.0 komplekts, stemCXP versija 2.0, WIN 7, TIKAI automatizētai paraugu analīzei plūsmas citometra sistēmā FC 500, kas aprīkota ar programmatūru CXP (versiju 2.0).

REZULTĀTI

Analīzes protokola iestatīšana

Plūsmas citometram ir jābūt aprīkotam tā, lai noteiktu uz priekšu vērsto izkliedi, sānu izkliedi un četrus fluorescences kanālus. FL3 kanālam (Stem-Count vai Flow-Count fluorosfēru uzraudzīšanai) izmantojiet 620 nm frekvenču joslas filtru. FL4 kanālam (7-AAD dzīvotspējas krāsvielu uzraudzīšanai) izmantojiet 675 nm garu caurlaides filtru.

Pārbaudiet, vai plūsmas citometrs ir pareizi pielāgots un standartizēts fluorescences intensitātei.

Nodrošiniet, lai plūsmas citometrs būtu pareizi noregulēts fluorescences kompensēšanai.

PIEZĪME. Paraugu analīzei visas reģionu pozīcijas ir aptuvenas līdz 45/34/7-AAD Nr. 1 mēģenes iegūšanas beigām. Reģioni tiek optimizēti atbilstoši tālāk norādītajam protokolam, un pēc tam tie NETIEK pielāgoti otrajai un trešajai mēģenei panelī.

Veicot paraugu analīzi, ir jāievēro 8 histogrammu sērija un atsijāšanas shēma (skatiet tālāk). Tā pati 8 histogrammu sērija un atsijāšanas shēma ir jāievēro, izmantojot CD34+ kontroles šūnas. Reģions A, B, C un D (reģiona definīciju skatiet sadaļā „Reģionu izveidošana”) ir jāpielāgo tā, lai tie ietvertu CD34+ kontroles šūnām raksturīgo klasteri.

Histogrammas izveide

Izveidojiet histogrammas šādi:

1. Izveidojiet 1. histogrammu kā FL1 CD45-FITC pret sānu izkliedi.
2. Izveidojiet 2. histogrammu kā FL2 CD34-PE pret sānu izkliedi.
3. Izveidojiet 3. histogrammu kā FL1 CD45-FITC pret sānu izkliedi.
4. Izveidojiet 4. histogrammu kā uz priekšu vērsto izkliedi pret sānu izkliedi.
5. Izveidojiet 5. histogrammu kā FL1 CD45-FITC pret FL2 CD34-PE.

6. Izveidojiet 6. histogrammu kā uz priekšu vērstu izkliedi pret sānu izkliedi.
 7. Izveidojiet 7. histogrammu kā laiku pret FL3 Stem-Count vai Flow-Count fluorosfērām.
 8. Izveidojiet 8. histogrammu kā FL4 7-AAD dzīvotspējas krāsvielu pret sānu izkliedi.
- 1.–4. histogramma ir paredzēta, lai raksturotu CD34+ HPC — procesu, kurš var aizkavēties līdz analīzes darbībai. Šīs pirmās četras histogrammas ir iestatītas saskaņā ar ISHAGE vadlīnijām par CD34+ šūnu noteikšanu ar plūsmas citometriju (1, 2). 5.–7. histogramma ir paredzēta, lai uzraudzītu parametrus, kas ir svarīgi iegūšanas darbības laikā. To skatā ietilpst uz priekšu vērsts izklijes diskriminators, savācamo CD45+ notikumu skaits un pareizā fluorosfēru singletu uzkrāšana.
8. histogramma ir paredzēta, lai no dzīvotnespējīgiem notikumiem nošķirtu dzīvotspējīgus notikumus un analizētu tos.

Reģiona izveide

Reģioni ir jāizveido tālāk aprakstītajā veidā.

1. 1. histogramma — izveidojiet 1. histogrammā taisnvirziena apgabalu A, iekļaujot visus CD45+ leikocītus un izslēdzot trombocītus, sarkano asinsķermenīšu atliekas un agregātus.
2. 1. histogramma — 1. histogrammā izveidojiet amorfu E reģionu, lai iekļautu limfocītus (spilgtu CD45, zemu sānu izkliedi).
3. 2. histogramma — 2. histogrammā izveidojiet taisnvirziena B reģionu, lai iekļautu visus CD34+ notikumus. Iestatiet 2. histogrammas apturēšanas skaitu pie 75 000 notikumiem (CD45+ notikumi).
4. 3. histogramma — izveidojiet 3. histogrammā amorfu apgabalu C, iekļaujot visus klasterizētos CD45dim notikumus.
5. 4. histogramma — 4. histogrammā izveidojiet amorfu D reģionu, iekļaujot tajā visus klasterizētos notikumus ar vidēju sānu izkliedi un vidēju līdz augstu uz priekšu vērstu izkliedi.
6. 5. histogramma — 5. histogrammā izveidojiet kvadrastatisku reģionu, lai pārbaudītu CD45 izteiksmes apakšējo robežu CD34+ notikumiem.
7. 5. histogramma — 5. histogrammā izveidojiet amorfu H reģionu, aptverot visas Stem-Count vai Flow-Count fluorosfēras, tostarp dubletus. H reģionam jāatrodas 5. histogrammas augšējā labajā stūrī.

PIEZĪME. H reģions ir jāzīmē kā AMORFS reģions.

8. 5. histogramma — izveidojiet taisnvirziena K reģionu (nosaukts par „listgate —” (saraksta atsijāšana)) 5. histogrammā. Iestatiet K reģiona robežas divu parametru histogrammas pirmajā reģistra dekādē. Šis K reģions ļauj novērst dubultās negatīvās sekas ieguves laikā, lai analizētu 75 000 atbilstošus CD45+ notikumus.
9. 6. histogramma — kopējiet apgabalu D no 4. histogrammas uz 6. histogrammu kā apgabalu F.
10. 7. histogramma — 7. histogrammā izveidojiet taisnvirziena lineāru G reģionu, lai tajā iekļautu tikai Stem-Count fluorosfēras vai Flow-Count fluorosfēras singletus. G reģionu var apzīmēt kā „CAL”, lai varētu automātiski aprēķināt absolūtos skaitļus CD34 + HPC (sīkāku informāciju skatiet ierīces lietošanas rokasgrāmatā).
11. 8. histogramma — izveidojiet 8. histogrammā taisnvirziena apgabalu J, iekļaujot dzīvotspējīgus leikocītus (7-AAD dzīvotspējas krāsvielas negatīvos notikumus).

Atsijāšanas faktoru izveide

Atsijāšanas faktori ir jāizveido tālāk aprakstītajā veidā.

1. 1. histogramma — piešķiriet „J” 1. histogrammai, lai rādītu visus dzīvotspējīgos notikumus. Ja 7-AAD netiek lietots, piešķiriet „H” reģionu 1. histogrammai, lai rādītu visus notikumus, izņemot visas Stem-Count fluorosfēras vai Flow-Count fluorosfēras, tostarp dubletus.
2. 2. histogramma — piešķiriet „AJ” (ja 7-AAD netiek lietots, piešķiriet „A”) 2. histogrammai, lai rādītu dzīvotspējīgos (ja 7-AAD netiek lietots, — lai rādītu kopējos) CD34+ notikumus.
3. 3. histogramma — piešķiriet „A” un „B” un „J” („A” un „B”, ja neizmanto 7-AAD) 3. histogrammai, lai parādītu visus dzīvotspējīgos (kopējos, ja neizmanto 7-AAD) CD45+/CD34+ notikumus.
4. 4. histogramma — piešķiriet apgabalus A, B, C un J (ja izmantojat 7-AAD, tad apgabalus A, B un C) 4. histogrammā, lai rādītu dzīvotspējīgus (ja izmantojat 7-AAD, tad kopējos) CD45+/CD34+ klasterizētus notikumus ar zemu sānu izkliedi, izslēdzot trombocītus un atliekas. Notikumi apgabalā ABCD ir patiesi dzīvotspējīgi CD34+ HPC notikumi.
5. 5. histogramma — neatsijāta, lai rādītu visus notikumus.
6. 6. histogramma — piešķiriet „EJ” (ja 7-AAD netiek lietots, piešķiriet „E”) 6. histogrammai, lai rādītu dzīvotspējīgos (ja 7-AAD netiek lietots, lai rādītu kopējos) limfocītus kā vizuālu diskriminatora pārbaudi.
7. 7. histogramma — piešķiriet „H” 7. histogrammai, lai rādītu visas Stem-Count fluorosfēras vai Flow-Count fluorosfēras, tostarp dubletus.
8. 8. histogramma — piešķiriet 8. histogrammai apgabalu A, lai rādītu CD45+ notikumus.

Plūsmas citometrijas iestatīšana

1. Pārbaudiet, vai plūsmas citometrs ir pareizi izlīdzināts un optimizēts FL1, FL2, FL3 un FL4 detektoru gaismas izkliedes un fluorescences intensitātei saskaņā ar ražotāja un laboratorijas vadlīnijām. Pārbaudiet, vai standarta darbībai ir iestatīta krāsu kompensācija. Papildu norādījumus skatiet instrumenta rokasgrāmatā.
2. Testa mēģenēm 5 sekundes ir jāveic virpuļveida maisīšana.
3. Veiciet datu iegūšanu plūsmas citometrā. Jāanalizē vismaz 75 000 CD45+ notikumi.
4. Paraugu analīzei: noregulējiet diskriminatoru un reģionus, analizējot parauga stobriņu 45/34/7-AAD Nr. 1. Saglabājiet protokolu un analizējiet stobriņu 45/34/7-AAD Nr. 2 un 45/CTRL/7-AAD bez papildu regulēšanas.

Analīzes piemērs

PIELIKUMĀ norādītās histogrammas tiek rādītas augošā secībā, kā parādīts protokolā.

CD34+ HPC aprēķins paraugam

CD34+ HPC skaits tiek aprēķināts kā apgabala D statistikas rezultātu vidējais rādītājs diviem reproducētajiem paraugiem (t.i., 45/34/7-AAD Nr. 1 un 45/34/7-AAD Nr. 2).

CD34+ HPC rezultāti ir uzskatāmi par derīgiem, ja rezultāti, kas iegūti, izmantojot CD45-FITC/ izokloniskas kontroles PE reaģentu, ir mazāki nekā 10 % no CD34+ HPC rezultātiem.

1. Rezultātu vidējais rādītājs, kas iegūts no 45/34/7-AAD Nr. 1 un 45/34/7-AAD Nr. 2 stobriņiem katram paraugam (t.i., apgabala D statistikas izdrukas rezultātu vidējais rādītājs). CD34+ HPC skaits parauga dublikātiem var svārstīties 10 % robežās no vidējā rādītāja. Vērtībai, kas iegūta ar 45/CTRL/7-AAD kontroles stobriņu, jābūt mazākai nekā 10 % no vidējās vērtības, kas iegūta testa stobriņiem, lai apstiprinātu rezultātus.

PIEZĪMES. Ja absolūtā skaitļa vidējais rādītājs, kas iegūts CD34+ HPC dublikātam, pārsniedz pieņemto diapazonu (t. i., pārsniedz 10 %), noskaidrojiet, vai pipetēšana ir veikta pareizi, jo īpaši attiecībā uz Stem-Count fluorosfērām vai Flow-Count fluorosfērām. Vizuāli pārbaudiet plūsmas citometra ziņojumus un krāsošanas un līzēšanas procesu kvalitāti jūsu testa stobriņos. Pārbaudiet, kā tika iestatītas reģiona robežas.

Ja vērtība, kas iegūta ar 45/CTRL/7-AAD, neietilpst pieņemto vērtību diapazonā (t. i., pārsniedz 10 % no absolūtā skaita, kas iegūts par dublikātu), noskaidrojiet, vai pipetēšana ir veikta pareizi, īpaši attiecībā uz Stem-Count fluorosfērām vai Flow-Count fluorosfērām. Vizuāli pārbaudiet plūsmas citometra ziņojumus un krāsošanas un līzēšanas procesu kvalitāti jūsu testa stobriņos. Pārbaudiet, kā tika iestatītas reģiona robežas.

Ja nepieciešams, atkārtojiet iegūšanas soli, papildinot ar TUKŠA parauga stobriņu pēc pirmā stobriņa dublikāta 45/34/7-AAD Nr. 1 un Nr. 2 un pirms stobriņa 45/CTRL/7-AAD. Ja nepieciešams, atkārtojiet visu sagatavošanas procesu ar jauniem stobriņiem, pievienojot TUKŠA parauga stobriņu. Iegūstiet un analizējiet gan jauno, gan iepriekšējo stobriņu sēriju. Salīdziniet abus rezultātus. Ja tie nesakrīt, sazinieties ar vietējo Beckman Coulter pārstāvi.

2. Ja paraugs ir atšķaidīts, iepriekš iegūtais rezultāts IR JĀREIZINA ar atbilstošo atšķaidījuma koeficientu (dilution factor — Dil). Beigās iegūtais rezultāts ir absolūtais CD34+ HPC skaits (šūnas/μl).

$$\text{CD34+ HPC absolūtais skaits (šūnas/μl)} = \text{CD34+ HPC absolūtā skaitļa izdrukas rezultāts (šūnas/μl)} \times \text{Dil}$$

3. Aferēzes blokiem kopējais CD34 + HPC skaitu vienā blokā var aprēķināt pēc šādas formulas:

$$\text{CD34+ HPC kopējais skaits blokā} = \text{CD34+ HPC absolūtais skaits (šūnas/μl)} \times 10^6 \times \text{bloka apjoms (l)}$$

Kur:

4. Lai noteiktu CD34+ HPC procentuālo daļu CD45+ leikocītu vērtības aprēķinā, skatiet tālāk norādīto formulu.

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{CD34+ HPC absolūtais skaits (šūnas/μl)} \quad \text{(t. i., D reģiona izdrukas rezultāti)}}{\text{CD45+ leikocītu absolūtais skaits (šūnas/μl)} \quad \text{(t.i., reģiona A izdrukas rezultāti)}} \times 100$$

KVALITĀTES KONTROLE

Pārliedziniet, vai plūsmas citometrs ir pareizi pielāgots saskaņā ar ražotāja ieteikumiem, kas norādīti ierīces lietošanas rokasgrāmatās. Ir noteiktas mērķa intensitātes, lai optimizētu gaismas izkliedes un fluorescences instrumentu iestatījumus tādu paraugu analīzei, kas iekrāsoti ar CD45-FITC / CD34-PE monoklonālo antivielu reaģentu un CD45-FITC / izokloniskās kontroles PE reaģentu.

Fluorhroma fluoresceīna izotiocianāts (FITC), fikoeritrīns (PE) un 7-amino-aktinomicīns D krāsviela (7-AAD) emitē pie dažādiem viļņa garumiem, bet tiem ir zināma spektrālā pārklāšanās, kas ir jākorrigē ar elektronisku kompensāciju. Optimālus kompensācijas līmeņus var noteikt, dubultparametru histogrammā analizējot pilnasins paraugu, kas piesūcināts ar Stem-Trol kontroles šūnām, kuras iekrāsotas ar 7-AAD dzīvotspējas krāsvielu, un atbilstošiem kompensācijas reaģentiem, lietojot programmatūru CXP. Šajā analizē tiek veiktas korekcijas, lai nodrošinātu, ka duālajā krāsu kvadrantā iekrāsošanu neveic jebkurš individuāls fluorohroms.

7-AAD dzīvotspējas krāsviela (7-amino-aktinomicīns D) tiek izmantota dzīvotnespējīgu šūnu identificēšanai ar plūsmas citometrijas analīzi, lai uzskaitītu interesējošās dzīvotspējīgās šūnas. Krāsvielu uzņem atmirušās šūnas (spilgtie notikumi), kas pēc tam tiek atsijātas no dzīvotspējīgām šūnām (negatīvie notikumi) (skatīt 8. histogrammu).

Pirms paraugi tiek analizēti, analizēta kontrole (Stem-Trol kontroles šūnas) jāiekrāso, lai verificētu antivielu reaktivitāti.

VEIKTSPĒJA

Piedāvātie veiktspējas raksturlielumi ir balstīti uz Stem-Kit reaģentiem, ko izmanto ar COULTER EPICS XL/XL-MCL plūsmas citometru ar System II programmatūru. Veiktspējas piemērus, strādājot ar FC 500 ar CXP programmatūru, skatiet stemCXP sistēmas rokasgrāmatā.

References diapazonu paredzamās vērtības

Lai noteiktu normālu atsauces diapazonu, no vīriešu dzimuma (n = 58) un sieviešu dzimuma (n = 59) populācijas tika savākti normāli pilnasins paraugi (n = 117). Šis pētījums tika veikts ārējā vērtēšanas vietā. Katram paraugam atkārtoti testi tika sagatavoti saskaņā ar Stem-Kit reaģentu lietošanas instrukciju. Lai iegūtu CD45+, CD34+ un CD34% vērtības, tika veikta manuāla atsijāšana un analīze.

Statistiskā analīze liecina, ka apkopotie dati neveido Gausa sadalījumu. Pamatojoties uz šiem rezultātiem, datu analīzei tika izmantota neparametriska (robusta) pieeja. Tika iegūtas CD45+, CD34+ un CD34% vērtības. Vērtības ir izteiktas kā absolūtais skaits (šūnas/μl) populācijai CD45+ un CD34+ un kā kopējā leikocītu skaita procentuālā daļa (CD34%), kā parādīts šajā tabulā.

Normāla pilnasins: references diapazoni

Manuālā metode (vispārīga analīze)	n	CD45+ (šūnas/μl)				CD34+ (šūnas/μl)				CD34+ (%)			
		Min.	Maks.	Vidējais	SN	Min.	Maks.	Vidējais	SN	Min.	Maks.	Vidējais	SN
Manuāli	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Šīm vērtībām ir tikai raksturojošs nolūks. Katrai laboratorijai jānosaka savas paredzamās vērtības, kas iegūtas no veseliem vietējās populācijas donoriem.

Linearitāte

Atkārtoti mērījumi tika veikti katrā no 10 sērijveida atšķaidījumiem 2 veidu paraugiem: perifērajām pilnasinīm un svaigām mobilizētām perifērajām pilnasinīm ar pievienoto CD34+. CD34+ HPC koncentrācijām tika sasniegts dinamiskais diapazons 0–2000 šūnu/μl un jutības zemā gala diapazons 0–150 šūnu/μl. Paraugi tika sagatavoti atbilstoši Stem-Kit reaģentu lietošanas instrukcijai un analizēti COULTER EPICS XL/XL-MCL plūsmas citometrā. Vērtības ir izteiktas absolūtajos skaitos (šūnas/μl). Rezultāti tika analizēti lineārās regresijas analīzēs, salīdzinot paredzamos un atgūtos absolūtos skaitus savā starpā un ņemot vērā reproducētu, mazāk endogēnu CD34+ šūnu vidējo vērtību. Skatiet tabulas tālāk.

Kopējo CD34+ HPC absolūto skaitu grafikos redzamo regresijas līniju slīpumi norāda uz linearitātes matemātisko mērījumu. Uz to norāda arī minimālās iespējamās testa novirzes, par ko liecina analīžu vienādojuma brīvais loceklis. Paredzamie absolūtie skaiti liecina par augstu korelāciju ar atgūtajiem absolūtajiem skaitiem.

CD34+ pastiprinātu pilnasinū rezultāti

Skatiet diagrammu pielikumā.

Perifēro (mobilizēto) asiņu rezultāti

Skatiet diagrammu pielikumā.

**Metodes precizitāte (tabulas)
(paredzētie rezultāti pret izgūtajiem rezultātiem)**

Metodes precizitāte tiek definēta kā atbilstības pakāpe starp gaidāmajiem un atgūtajiem rezultātiem gan manuālas, gan automatizētas atsijāšanas un analīzes metodē. Svaigai, normālai perifērajai pilnasinij tika pievienotas attīrītas CD34+ šūnas līdz 1875 šūnu/μl līmenim. Šūnu skaitu apstiprināja ar Malasē (Malassez) slaidu hemocitometru un sērijveidā atšķaidīja līdz dažādām koncentrācijām. Sagaidāmie rezultāti tiek salīdzināti ar atgūtajiem rezultātiem, ņemot vērā mērījumu dublikātu vidējās vērtības, izmantojot automatizētu un manuālu atsijāšanu un analīzi katram atšķaidījuma līmenim. Slīpuma un ordinātu pārbaude krustpunktā ar asi neliecina par statistisku atšķirību starp automatizēto atsijāšanu un analīzi un paredzētajiem rezultātiem, nedz arī starp manuālo atsijāšanu un analīzi un paredzētajiem rezultātiem.

Metodes precizitāte — CD34+ (%)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Metodes precizitāte — CD34+ absolūtais skaits (šūnas/μl)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Metodes precizitāte — leukocītu kopskaits — CD45+ (šūnas/ μ l)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Metodes precizitāte (automatizēti pret manuāliem rezultātiem)

Precizitātes pakāpe starp stemONE sistēmas automatizēto un manuālo metodi tika pētīta četrās ārējās vērtēšanas vietās, izmantojot svaigu perifēro pilnasini un svaigu vai atkausētu aferēzi, nabas saites asinis un kaulu smadzeņu paraugus. Ticamības intervāli (TI) tika aprēķināti ar 95 % robežām.

Svaigu perifēro pilnasiņu (n = 59 no trīs vietām), svaigu aferēzes produktu (n = 51 no trīs vietām), svaigu nabas saites asiņu (n = 29 no divām vietām), svaigu kaulu smadzeņu (n = 33 no divām vietām), atkausētu aferēzes produktu (n = 23 no vienas vietas), atkausētu nabas saites asiņu (n = 31 no divām vietām) un atkausētu kaulu smadzeņu (n = 20 no vienas vietas) paraugi tika sagatavoti atbilstoši Stem-Kit reaģentu iepakojuma ieliktnim un analizēti COULTER EPICS XL/XL-MCL plūsmas citometros. Tika veikta automatizēta un manuāla atsijāšana un analīze, lai iegūtu CD45+, CD34+ un CD34% vērtības.

Metodes precizitāte (skaitļi)

Svaigas perifērās pilnasins paraugi (n = 59)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Svaigi aferēzes paraugi (n = 51)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Svaigi nabas saites asins paraugi (n = 29)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Svaigi kaulu smadzeņu paraugi (n = 33)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Atkausēti aferēzes paraugi (n = 23)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Atkausēti nabas saites asins paraugi (n = 31)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Atkausēti kaulu smadzeņu paraugi (n = 20)

Skatiet diagrammu pielikumā.

Precizitāte

Starplaboratoriju precizitāte

pētījumus veica vienā klīniskajā iestādē trīs operatori, katram operatoram izmantojot citu plūsmas citometru. Tika identificēti trīs paraugi ar CD34+ dinamisko diapazonu (0–2000 šūnu/ μ l):

Zems diapazons: svaigas, mobilizētas perifērās asinis

Vidējais diapazons: aferēzes produkts

Augsts diapazons: aferēzes produkts

Šie paraugi tika sadalīti trīs alikvotās, un katram no trim operatoriem tika izsniegta viena alikvota no katra līmeņa (zema, vidēja, augsta). Paraugi tika sagatavoti (n = 10) no katras alikvotas saskaņā ar Stem-Kit reaģentu lietošanas instrukciju. Katrs operators veica analīzi EPICS XL plūsmas citometrā, izmantojot automatizētu un manuālu atsijāšanu un analīzi, lai iegūtu CD45+, CD34+ un CD34% vērtības. Vērtības ir izteiktas kā procenti (%) no kopējā leukocītu skaita un kā absolūtais skaits (šūnas/ μ l).

starplaboratoriju precizitātes pētījuma rezultāti pa līmeņiem ir sniegti tālāk esošajās tabulās. Vērtības, kas iegūtas CD45+ un CD34+ absolūtajiem skaitiem un CD34 procentiem, uzrādīja mazas atšķirības, par ko liecina atkārtoto mērījumu vidējās vērtības, standarta novirzes un variācijas koeficienti.

Skatiet diagrammu pielikumā.

Precizitāte laboratorijas robežās

Paraugi, kas aptver testa dinamisko diapazonu, tika iegūti, izmantojot svaigu perifēro pilnasini, svaigas kaulu smadzenes un šādus gan svaigus, gan atkausētus paraugus: aferēzi un nabas saites asinis no četrām ārējām vērtēšanas vietām. Desmit katra veida paraugi tika sagatavoti saskaņā ar Stem-Kit reaģentu lietošanas instrukciju un analizēti COULTER EPICS XL/XL-MCL plūsmas citometros, izmantojot manuālu atsijāšanu un analīzi, lai iegūtu CD45+, CD34+ un CD34% vērtības.

Nākamajās tabulās norādītās CD45+, CD34+ un CD34% vērtības demonstrē, ka analīzes metode ir reproducējama, kā pierādīts ar šo mērījumu vidējām vērtībām, standartnovirzēm un variācijas koeficientiem. PIELIKUMĀ redzamajās datu tabulās ir redzama šī testa precizitāte laboratorijas robežās.

Skatiet diagrammu pielikumā.

IEROBEŽOJUMI

Ja izmantojat automatizēto metodi, informāciju par ierobežojumiem skatiet rokasgrāmatā stemCXP System Guide (sistēmas stemCXP rokasgrāmata), kas iekļauta sistēmas programmatūras stemCXP komplektā.

- Iekrāsoti un lizēti paraugi ir jāglabā uz ledus, un tie ir jāanalizē plūsmas citometrā saskaņā ar sadaļā „Apstrādāta parauga stabilitāte” sniegto informāciju, citādi var rasties kļūdaini rezultāti.
- Reaģentus nedrīkst atšķaidīt, dalīt alikvotās un sasaldēt. Izmantojiet tikai oriģinālajā iepakojumā.
- Reaģenti ir paredzēti izmantošanai tikai plūsmas citometrijā.
- Lai nodrošinātu optimālu iekrāsošanos, pienācīgi atkausējiet saldētus paraugus.
- Visiem sarkanajiem asinsķermenīšiem lizēšana var nenotikt šo apstākļu dēļ: atdalītu sarkano asinsķermenīšu klātbūtne, anormāla proteīna koncentrācija vai hemoglobīnopātija. Tas var izraisīt nepatiesi samazinātus CD34% rezultātus dēļ tā, ka nelizēti sarkanie asinsķermenīši tika uzskaitīti kā leukocīti. CD34+ un CD45+ absolūtos skaitus nedrīkst ietekmēt.
- Atsevišķi pacienti var sagādāt īpašas problēmas, jo ir mainījies noteiktu šūnu populāciju skaits vai to skaits ir ļoti mazs.
- Rezultāti, kas iegūti ar plūsmas citometriju, var būt kļūdaini, ja reģions ir nepareizi iestatīts.
- Stem-Kit reaģentiem ir paredzēts lietot 7-AAD dzīvotspējas krāsvielu, lai noteiktu HPC dzīvotspējīgās šūnas. Ja jūsu laboratorija izmanto alternatīvu dzīvotspējas noteikšanas metodi, ievērojiet vispārīgo labo laboratorijas praksi un jūsu laboratorijas kvalitātes kontroles procedūras, lai nodrošinātu ziņoto rezultātu kvalitāti.

PREČU ZĪMES

Beckman Coulter, stilizētais logotips un Beckman Coulter preču un pakalpojumu zīmes, kas minētas šeit, ir Beckman Coulter, Inc. preču zīmes vai reģistrētas preču zīmes Amerikas Savienotajās Valstīs un citās valstīs.

PAPILDINFORMĀCIJA

www.beckmancoulter.com

Simbolu skaidrojumi

Simbolu glosārijs ir pieejams vietnē beckman.com/techdocs (dokumenta numurs B60062)

Реагенти Stem-Kit

REF IM3630 50 тестів

Для діагностики *in vitro*.

ПРИЗНАЧЕННЯ

Реагенти Stem-Kit складаються з двоколірного флуоресцентного реагенту (FITC, PE) мишачого моноклонального антитіла, двоколірного флуоресцентного мишачого (FITC, PE) ізоклонічного контролю, реагенту для розрахунку абсолютного числа, реагенту для визначення життєздатності клітин, та реагенту для лізису. Він призначений «Для діагностики In Vitro» для одночасної ідентифікації та підрахунку процентних значень популяції клітин CD45+ та подвійно-позитивної популяції клітин CD45+ CD34+, а також абсолютного числа в біологічних зразках методом проточної цитометрії. Біологічні зразки включають свіжу нормальну або мобілізовану периферичну цільну кров, свіжі або розморожені продукти аферезу, пуповинну кров і кістковий мозок. Вимірювання популяції клітин можна отримати за допомогою автоматизованого методу або ручного методу гейтування та аналізу.

Повні інструкції див. в Інструкції з використання реагентів Stem-Kit, якщо використовується ручний спосіб. При використанні автоматизованого способу зверніться до stemCXP System Guide (посібника з використання системи stemCXP), наданого з пакетом програмного забезпечення stemCXP 2.0 і stemCXP версії 2.0, WIN 7, за повними інструкціями.

СТИСЛА ІНФОРМАЦІЯ

Гематopoетичні клітини-попередники (HPC)

Реагенти Stem-Kit призначені для ідентифікації гематopoетичних клітин-попередників (HPC) людини із застосуванням наступних критеріїв: «Істинні клітини CD34+ (а) експресують антиген CD34, (б) експресують антиген CD45 з інтенсивністю фарбування, характерною для бластних клітин (тобто, легко виявляються але на більш низьких рівнях, ніж лімфоцити та моноцити), і (в) виявляють низький рівень характеристик бічного і низький або середній рівень характеристик прямого розсіювання світла бластних клітин» (1). Виключення мертвих CD34+ HPC з життєздатного переліку CD34+ HPC досягається за допомогою барвника життєздатних клітин 7-AAD (2).

CD34

Антиген CD34 належить до сімейства диференційно трансмембранних одноланцюгових глікопротеїнів першого типу (3, 4, 5). Він експресується практично у всіх кровотворних клітинах-попередниках, включаючи мультипотентні стовбурові клітини. Епітопи CD34 були розділені на три класи на основі чутливості до нейрамінідази та глікопротеази *Pasteurella haemolytica* (6). Моноклональне антитіло CD34 (MAT), яке використовується в реагентах Stem-Kit, називається 581. Воно спеціально визнає епітоп класу III молекули CD34 (7), як визначено патернами ферментативного розщеплення (6, 8). Це моноклональне антитіло 581 було віднесено до CD34 під час п'ятого семінару HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (семінару HLDA з питань антигенів для диференціації лейкоцитів людини), що проходив у Бостоні, штат Массачусетс, США, в 1993 році (7).

CD45

Антитіло CD45 розпізнає членів сімейства панк-лейкоцитарних антигенів CD45 з молекулярною масою 180, 190, 210 і 220 кДа (9, 10, 11). Воно також відоме як загальний лейкоцитарний антиген (LCA). Антиген CD45 експресується на поверхні кожного типу гематopoетичних клітин, за винятком зрілих еритроцитів та їх безпосередніх попередників (11, 12). Він не був виявлений в диференційованій негематopoетичній тканині (12, 13, 14, 15). MAT CD45, яке використовується у реагентах Stem-Kit, називається J33. Воно було віднесено до CD45 під час третього семінару HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (семінару HLDA з питань антигенів для диференціації лейкоцитів людини), який проходив в Оксфордї, Англія, в 1986 році (16).

7-AAD

Барвник життєздатних клітин 7-аміно-актиноміцин D (7-AAD) є аналогом актиноміцину D, який містить заміщену аміногрупу в положенні 7 хромофору. Барвник життєздатних клітин 7-AAD інтеркалює між цитозиновими і гуаніновими основами ДНК (15). Актиноміцини — це біологічно активні сполуки, що містять 2-аміно-4,6 диметилфеноксазон-3 хромофор та два циклічні пентапептиди (17). Актиноміцини утворюють стабільні комплекси з дволанцюговою дезоксирибонуклеїновою кислотою (ДНК), але не з дволанцюговою рибонуклеїновою кислотою (РНК), а також не з гібридами РНК-ДНК або з одноланцюговою ДНК або РНК (15, 18).

Спектральні властивості барвника життєздатних клітин 7-AAD роблять цю молекулу особливо придатною для аналізу методом проточної цитометрії (17). Максимальне поглинання комплексу 7-AAD / ДНК розташоване в зеленій спектральній області і, таким чином, придатне для цитометра, оснащеного аргоновим лазером (довжина хвилі збудження 488 нм) (15). Глибокий червоний викид флуоресценції барвника життєздатних клітин 7-AAD (від 635 до 675 нм) полегшує використання даного зонду в комбінації з флуоресцеїну ізотіоціанатом (FITC) та антитілами кон'югованими фікоеритрином (PE), оскільки, на відміну від пропідію йодиду (PI) комплекс 7-AAD / ДНК демонструє мінімальне спектральне перекриття з FITC і PE (17).

Апоптичні, некротичні та/або пошкоджені клітини є джерелами інтерференції при аналізі життєздатних клітин методом проточної цитометрії. Нежиттєздатні клітини слід оцінювати та розрізняти, фокусуючись на 7-AAD-позитивному забарвленні, коли життєздатні клітини залишаються незафарбованими (негативними) (19).

Системи поточних цитометрів

Системи проточного цитометра (FC 500) застосовують принципи проточної цитометрії для аналізу біологічних зразків для виявлення різних популяцій клітин, визначених специфічними моноклональними антитілами та використаними флуорохромами. Цей тест використовується для аналізу проб на системах проточного цитометра FC 500, оснащених програмним забезпеченням системи CXP.

ПРИНЦИП

Цей тест залежить від здатності моноклонального антитіла зв'язуватися з поверхнею клітин, що експресують дискретні антигенні детермінанти. Реагент CD45-FITC / CD34-PE у реагентах Stem-Kit являє собою комбінацію двох мишачих моноклональних антитіл; кожне з яких кон'юговане до специфічного флуорохрому і є специфічним для іншого поверхневого антигену клітини. Специфічне забарвлення клітинної поверхні здійснюється шляхом інкубування дублікатів зразків біологічного зразка з двоколіровим реагентом CD45-FITC / CD34-PE.

Додаткове випробування одного зразка, який забарвлюють реагентом CD45-FITC / IsoClonic Control-PE для перевірки неспецифічного зв'язування моноклонального антитіла CD34-PE. Барвник життєздатних клітин 7-AAD, барвник нуклеїнової кислоти, який зв'язується з доступними основними парами (клітинна ДНК), використовується для розрізнення життєздатних та нежиттєздатних клітин. Еритроцити в кожному зразку лізують розчином для лізису NH₄Cl, який готують при 1X. Додають флуоросфери Stem-Count або флуоросфери Flow-Count (реагент для підрахунку абсолютного числа), а залишкові клітини аналізують за допомогою проточної цитометрії. Контроль процесу та контроль якості аналізу забезпечуються приладом та реагентами для контролю якості зразка: флуоросферами Flow-Check, флуоросферами Flow-Set, відповідними компенсаційними реагентами та контрольними клітинами Stem-Trol Control Cells.

ПРИКЛАДИ КЛІНІЧНИХ ЗАСТОСУВАНЬ

Хронологія наукових доповідей стосовно гемопоетичних клітин-попередників (HPC) показує, що ранні дослідження спираються на кількість ядровмісних клітин для кількісного визначення. Подальші дослідження, що включають аналіз колоній утворюючих одиниць (КУО) забезпечили грубі наближення популяцій клітин-попередників. За аналізами КУО, які займали багато часу, слідувало відкриття поверхневої молекули клітини CD34. Встановлено, що CD34 присутній на поверхні ранніх гемопоетичних клітин та гемопоетичних колоній утворюючих клітин у кістковому мозку та периферичній крові (20). Потім моноклональні антитіла, спрямовані проти молекули CD34, були розроблені та використані у проточній цитометрії. Визначення CD34 за допомогою проточної цитометрії широко прийнято в якості засобу для оцінки гемопоетичних попередників та стовбурових клітин.

У кістковому мозку здорових осіб, від 1 до 3% клітин, що експресують антиген CD34, здатні відтворювати довготривалий багатолінійний гематопоез (3, 20). У периферичній крові здорових осіб менше 0,1% циркулюючих клітин експресує антиген CD34 (1, 21). Використання реагентів Stem-Kit забезпечує простий, швидкий та чутливий метод проточної цитометрії для підрахунку гемопоетичних попередників та стовбурових клітин у периферичній крові, продуктах лейкофери, кісткового мозку та пуповинної крові.

СКЛАД РЕАГЕНТІВ

Реагенти Stem-Kit містять наступне:

- Реагент CD45-FITC / CD34-PE (45/34) – 1 флакон.
- Реагент CD45-FITC / IsoClonic Control-PE (45/CTRL) – 1 флакон.
- Флуоросфери Stem-Count – 1 флакон.
- Барвник життєздатних клітин 7-AAD – 1 флакон.
- Розчин для лізису 10X NH₄Cl – 2 флакони.

1. Ці реагенти повинні використовуватися у комплекті, який постачається в наборі.

Флуоросфери Flow-Count, еквівалентні флуоросферам Stem-Count, можуть бути використані для визначення абсолютного числа, якщо використовувати специфічну досліджувану концентрацію.

2. CD45-FITC / CD34-PE являє собою готовий до використання двоколірний реагент, який постачається в 2,2 мл фосфатно-буферному фізіологічному розчині (ФСБ), що містить 2 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA) та 0,1% азиду натрію у якості консерванту.
3. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE являє собою готовий до використання двоколірний реагент, який постачається в 1,2 мл ФСБ, що містить 2 мг/мл BSA та 0,1% азиду натрію у якості консерванту. Реагент CD45-FITC / IsoClonic Control-PE – це суміш некон'югованого та PE-кон'югованого (CD34-ідентичного) моноклонального антитіла 581. Ця суміш виступає в якості відповідного, ізоморфного контролю, для перевірки неспецифічного зв'язування MAT CD34-PE на кожному зразку.

ПРИМІТКА. Реагенти CD45-FITC / CD34-PE та CD45-FITC / IsoClonic Control-PE не повинні бути розділені. Під час виконання тестів та контролів слід переконаватися, щоб на етикетках флаконів із обома реагентами було зазначено однаковий номер партії.

Підсумок характеристик антитіл

Специфічність	CD45	CD34
Клон	J33	581
Гібридома	NS1 × Balb/c	NSO × Balb/c
Імуноген	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ланцюг Ig	IgG1, κ легкі ланцюги	IgG1, κ легкі ланцюги
Вид	Миша	Миша
Кон'югація	Флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC)	R-фікоеритрин (PE)
Молярне співвідношення	5–8 моль FITC / моль Ig	0,5–1,5 моль PE / моль Ig
Довжина хвилі збудження	488 нмоль (синьо-зелений)	488 нмоль (синьо-зелений)
Викид флуоресценції	Від 504 до 541 нм (переважно зелений)	Від 568 до 590 нм (переважно помаранчевий)

- Флуоросфери Stem-Count або флуоросфери Flow-Count складаються з 10 мкм (номінальний діаметр) полістиролових флуоресцентних мікросфер в 20 мл середовищі водної суспензії, що містить поверхнево-активну речовину та 1% формальдегід. Кожна флуоросфера містить барвник, який має діапазон викиду флуоресценції від 525 нм до 700 нм при збудженні при 488 нм. Проаналізована концентрація флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count (флуоросфери/мкл) була отримана з аналізів у декількох повторностях за допомогою аналізатора розміру частинок COULTER. Значення, специфічне для кожної партії, вказано на етикетці флакона.
- Барвник життєздатних клітин 7-AAD постачається у 99% фосфатно-буферному фізіологічному розчині (ФСБ: 0,01 моль фосфат натрію, 0,145 моль хлорид натрію, pH 7,2), з 1% диметилсульфоксидом (ДМСО).
- Розчин для лізису NH_4Cl постачається у вигляді 10X концентрованого розчину обсягом 20 мл. Він містить суміш хлориду амонію (NH_4Cl), бікарбонату калію (KHCO_2), динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA).

ПОПЕРЕДЖЕННЯ Й ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Препарати моноклональних антитіл містять 0,1% азиду натрію. Азид натрію в кислотних умовах утворює азотоводневу кислоту, яка є надзвичайно токсичною сполукою. Утилізація в каналізаційні системи повинна супроводжуватися великою кількістю проточної води, щоб уникнути небезпечного накопичування у металевих трубах та потенційних вибухів.
- Проби, зразки та всі матеріали, що контактують із ними, слід обробляти так, немов вони здатні передавати інфекцію, а також утилізувати, застосовуючи належні запобіжні заходи.
- Ніколи не піпетуйте ротом та уникайте контакту зразків або реагентів зі шкірою та слизовими оболонками.
- Не використовуйте реагенти після завершення терміну придатності, зазначеного на етикетці флакона.
- Флуоросфери Stem-Count або флуоросфери Flow-Count містять 1% формальдегіду. Слід уникати контакту зі шкірою та очима, оскільки формальдегід може викликати незворотні ефекти для цих тканин. Не вдихати пари. Носіть відповідні засоби захисту, такі як рукавички та окуляри.
- Захищайте реагенти Stem-Kit від дії яскравого світла та джерел тепла під час зберігання чи використання.
- Уникайте випаровування та витоку флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count для запобігання отримання помилкових результатів. Щільно закривайте флакони після застосування та зберігайте у вертикальному положенні.
- Переконайтеся, що перед використанням флуоросфери повністю ресуспендовані. Уникайте надмірного змішування, щоб мінімізувати утворення повітряних бульбашок. Не додавайте піпеткою повітряні бульбашки задля уникнення помилкових результатів.
- Використовуйте калібровані піпетки (з прямим витісненням або капіляри, бажано) для дозування зразків і флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count, щоб уникнути помилкових результатів.
- Використовуйте методики піпетування, рекомендовані виробником піпетки для забезпечення точного та прецизійного піпетування зразків та флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count, щоб уникнути помилкових результатів.
- Забарвлені та пролізовані проби слід зберігати на льоду та аналізувати на проточному цитометрі відповідно до інформації, наведеної в розділі «Стабільність обробленої проби», інакше можуть виникнути помилкові результати.
- Переконайтеся, що підраховується щонайменше 1000 флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count, в іншому випадку автоматичне перетворення результатів у абсолютні значення не відбудеться.

13. Кожна партія флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count має певну концентрацію флуоросфер. Переконайтеся, що для визначення абсолютного результату підрахунку використовується правильна концентрація.
14. Методи приготування, що потребують етапу промивання, не повинні використовуватися через невідому втрату клітин.
15. Застосування часу і температура інкубації або змішування, які відрізняються від указаних, можуть призвести до отримання помилкових результатів.
16. Барвник життєздатних клітин 7-AAD містить 0,005% 7-AAD. Чистий 7-AAD є потенційним канцерогеном. Незважаючи на те, що ця сполука сильно розбавляється, ми рекомендуємо уникати контакту зі шкірою та очима, носити відповідний захисний одяг та рукавички, а також відповідні окуляри/маску.
17. Барвник життєздатних клітин 7-AAD містить 1% диметилсульфоксид (ДМСО). Чистий ДМСО є подразником. Незважаючи на те, що ця сполука розбавляється, ми рекомендуємо уникати контакту зі шкірою та очима, носити відповідний захисний одяг та рукавички, а також відповідні окуляри/маску.
18. Як хромофор, 7-AAD чутливий до світла. Зберігайте барвник життєздатних клітин 7-AAD у картонній упаковці, щоб запобігти постійного впливу світла під час зберігання.
19. Слід мінімізувати вплив світла на змішані зразки під час інкубації.
20. Під час роботи з реагентами дотримуйтеся загальних стандартів належної лабораторної практики.

КЛАСИФІКАЦІЯ НЕБЕЗПЕКИ ЗА СИСТЕМОЮ GHS

Флуоросфери Stem-Count

НЕБЕЗПЕКА



H316

Викликає незначне подразнення шкіри.

H317

Може викликати алергічну реакцію на шкірі.

H350

Може викликати рак.

P201

Перед використанням ознайомитися з відповідними інструкціями.

P280

Використовувати захисні рукавички, захисний одяг і засоби захисту очей/обличчя.

P308+P313

У ВИПАДКУ впливу або стурбованості: звернутися до лікаря.

P333+P313

У випадку подразнення шкіри або появи висипу: звернутися до лікаря.

P362+P364

Зняти забруднений одяг і випрати його перед повторним використанням.

Формальдегід 0,5 - 1,0%

Реактивна маса:

5-хлор-2-метил-4-ізотіазолін-3-он [шифр КФ 247-500-7] і

2-метил-4-ізотіазолін-3-он [шифр КФ 220-239-6] (3:1) < 0,05%

Барвник для визначення життєздатності 7-AAD

ПОПЕРЕДЖЕННЯ

H316

Викликає незначне подразнення шкіри.

P332+P313

У випадку подразнення шкіри: звернутися до лікаря.

Диметилсульфоксид 0,5 - 2%



Паспорт безпеки доступний на сайті beckman.com/techdocs

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Невідкритий реагент стабільний до закінчення терміну придатності, зазначеного на флаконі, при зберіганні при температурі 2–8°C у темному місці. Не використовуйте після завершення терміну придатності. Не заморожуйте. Реагенти Stem-Kit є стабільними протягом 30 днів після відкриття флаконів з флуоросферами Stem-Count або Flow-Count. Відкриті флакони слід повторно закрити ковпачком відразу після використання та зберігати при температурі 2–8°C в темному місці. НЕ відбирайте аліквоти флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count з оригінального флакона.

ВАЖЛИВО: Існує ризик помилкових результатів у разі витоку флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count. Після відкриття флуоросфери Stem-Count або флуоросфери Flow-Count слід зберігати у вертикальному положенні, щоб запобігти можливості витоку. Реагенти не слід використовувати, якщо спостерігаються ознаки витоку.

Ознаки псування

Ознаки псування можуть виникнути в наступних ситуаціях:

Реагенти Stem-Kit, за винятком флуоросфер Stem-Count

- Зміна нормального зовнішнього вигляду, як зазначено нижче

Реагент	Нормальний зовнішній вигляд
CD45-FITC / CD34-PE	Прозора, злегка рожева рідина
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Прозора або злегка рожева рідини
Барвник для визначення життєздатності 7-AAD	Прозора, злегка рожева або червонувата рідина
Розчин для лізису NH_4Cl	Прозора безбарвна рідина

Stem-Count Fluorospheres

- Зовнішній вигляд під час збору даних вторинних флуоресцентних популяцій, що містять понад 20% загальної популяції флуоросфер.
- Значне відхилення значень, отриманих для чисел або зразків.

ВАЖЛИВО: Реагенти не слід використовувати, якщо є ознаки псування, оскільки можна отримати невірні результати. Зверніться до місцевого представника компанії Beckman Coulter у разі наявності даних про псування.

Підготовка реагенту

- Двоколірні реагенти CD45-FITC / CD34-PE та CD45-FITC / IsoClonic Control-PE використовуються безпосередньо з флаконів без будь-якого розведення.
- Флуоросфери Stem-Count або флуоросфери Flow-Count використовуються безпосередньо з флакону без будь-якого розведення. Усі алюмінієві плівки з термоупаковки слід зняти з верху пляшки при першому відкритті. Необхідне правильне змішування. При першій обробці флаконів з флуоросферами Stem-Count або флуоросферами Flow-Count на початку дня, їх вміст слід перемішати у вортексі протягом 3–5 секунд.

Перед піпетуванням з флакону, обережно перемішайте вміст, перевертаючи флакон 3–5 разів.

Після початкового перемішування у вортексі на початку дня поверніть флуоросферу у флакон та зберігайте при температурі 2–8°C до використання.

Уникайте випаровування та витоку, щільно закриваючи флакон ковпачком після застосування.

- Барвник життєздатних клітин 7-AAD використовується безпосередньо з флакону без будь-якого розведення.
- Розчин для лізису А 1X NH_4Cl слід готувати щодня: додайте 9 об'ємів деіонізованої води до одного об'єму 10X концентрованого розчину для лізису NH_4Cl . Не охолоджуйте зразки. В кінці дня слід утилізувати невикористаний розчин для лізису 1X NH_4Cl .

Перед використанням усі реагенти необхідно довести до кімнатної температури (18–25°C).

ПОВОДЖЕННЯ ЗІ ЗРАЗКОМ

Вимоги до зразків

Короткий опис обробки проб:

Тип зразка	Спосіб гейтування	Температура зберігання	Вік зразка
Аферез	Алгоритм	2–8°C	24 години
	Вручну	2–8°C	24 години

Кістковий мозок	Алгоритм	2–8°C	24 години
	Вручну	2–8°C	24 години
Пуповинна кров	Алгоритм	18–25°C	24 години
	Вручну	18–25°C	24 години
Нормальна цільна кров	Алгоритм	18–25°C	20 годин
	Вручну	18–25°C	20 годин
Мобілізована цільна кров	Алгоритм	18–25°C	20 годин
	Вручну	18–25°C	20 годин

1. Біологічні зразки включають свіжу нормальну або мобілізовану периферичну цільну кров, свіжі або розморожені продукти аферезу, пуповинну кров і кістковий мозок.
2. Оброблені або очищені гематопоетичні клітини-попередники (НРС) можна проаналізувати лише за допомогою ручного методу гейтування.
3. Зберіть продукти аферезу, зразки периферичної крові, зразки пуповинної крові або зразки кісткового мозку в асептичних умовах у стерильну вакуумну пробірку для забору крові з антикоагулянтом ACD, формула А, або КЗ ЕДТА.
4. Зразки цільної крові та мобілізованої цільної крові, зібрані в пробірки з антикоагулянтом, можна зберігати до 20 годин за кімнатної температури (18–25°C), перш ніж фарбувати їх для оцінювання забарвлення.
5. Зразки пуповинної крові, зібрані в пробірки з антикоагулянтом, можна зберігати до 24 годин за кімнатної температури (18–25°C), перш ніж фарбувати їх для оцінювання забарвлення.
6. Зібрані продукти аферезу та зразки кісткового мозку можна зберігати до 24 годин при температурі 2–8°C перед забарвленням.
7. Перед підготовкою зразка переконайтеся, що концентрація лейкоцитів (БКТ) не перевищує 30×10^9 БКТ/л. Якщо необхідно, розбавте зразок за допомогою HBSS або еквівалентного розчину для досягнення середнього значення 15×10^9 БКТ/л. Запишіть коефіцієнт розведення для підрахунку кінцевого абсолютного числа НРС.
8. Низька концентрація білка може спричинити агрегацію флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count і видати помилково високий показник абсолютного числа клітин. Розведення зразків з низькою концентрацією білка повинно проводитися з використанням збагаченого білком буфера.
9. Усі зразки слід обробляти реагентами Stem-Kit, включаючи барвник життєздатних клітин 7-AAD.

Процедура обробки зразків

Виконайте тести в двох повторностях, дотримуючись «Рекомендацій ISHAGE щодо визначення клітин CD34+ методом проточної цитометрії» (1).

ПРИМІТКА. При обробці контрольних клітин Stem-Trol, для отримання повних інструкцій див. Інструкцію з використання контрольних клітин Stem-Trol, якщо використовуєте ручний метод. Для отримання повних інструкцій, якщо використовується метод автоматизованого аналізу, зверніться до посібника з використання системи stemONE, який надається з програмним забезпеченням до системи stemONE або до посібника з використання системи stemCXP, який надається з програмним забезпеченням до системи stemCXP.

1. Промаркуйте три пробірки кожного зразка наступним чином:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Перенесіть піпеткою 20 мкл реагенту CD45-FITC / CD34-PE у пробірки: 45/34/7-AAD № 1 та 45/34/7-AAD № 2.
3. Перенесіть піпеткою 20 мкл реагенту CD45-FITC / IsoClonic Control-PE у пробірку: 45/CTRL/7-AAD.
4. Перенесіть піпеткою 20 мкл барвника життєздатних клітин 7-AAD у всі пробірки.

ВАЖЛИВО: Існує ризик неповного лізису, якщо зразок крові залишається на верхній частині або боковій поверхні тестової пробірки. Будьте обережні, коли проводите піпетування, щоб уникнути контакту крові з верхньою частиною або боковою поверхню пробірки. Якщо необхідно, протріть пробірку ватним тампоном, щоб видалити всі сліди зразку крові з верхньої частини або бокової поверхні пробірки.

5. За допомогою піпетки з позитивним переміщенням або піпетки для багаторазового дозування перенесіть 100 мкл зразка пацієнта у пробірку.

6. Негайно перемішайте у вортєксі вміст пробірки протягом 5 секунд.
7. Інкубуйте усі пробірки при кімнатній температурі (18–25°C) протягом 20 хвилин у захищеному від світла місці.
8. Після інкубації до кожної трубки додайте по 2 мл готового 1X розчину для лізису NH₄Cl і негайно перемішайте у вортєксі протягом 5 секунд.

ПРИМІТКА. Детальну інформацію щодо підготовки розчину для лізису див. у розділі 7.2 вище, що має назву ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ.

ВАЖЛИВО: Існує ризик помилкових результатів у разі перенесення піпеткою повітряних бульбашок. Надмірне змішування флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count може спричинити утворення бульбашок повітря. Уникайте надмірного змішування флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count і не переносьте піпеткою повітряні бульбашки в пробірки.

9. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 10 хвилин у захищеному від світла місці.
10. Перед використанням обережно змішайте флуоросфери Stem-Count або флуоросфери Flow-Count, перевертаючи флакон 3–5 разів.
11. Перед збором даних та відразу після виконання кроку 9, використовуючи піпетку з позитивним витисненням або піпетку для багаторазового дозування, перенесіть піпеткою 100 мкл флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count в кожну з трьох пробірок.
12. Негайно перемішайте у вортєксі вміст кожної пробірки протягом 5 секунд.

ПРИМІТКА. Детальну інформацію щодо підготовки розчину для лізису див. у розділі 7.2 вище, що має назву ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ.

Короткий опис фарбування зразків

Реагенти / зразки	45/34/7-AAD #1	Етикетка тестової пробірки 45/34/7-AAD №2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 мкл	20 мкл	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 мкл
Барвник для визначення життєздатності 7-AAD	20 мкл	20 мкл	20 мкл
Зразок	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Перемішайте у вортєксі – Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Захищати від світла.			
Розчин для лізису 1X NH ₄ Cl	2 мл	2 мл	2 мл
Перемішайте у вортєксі – Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Захищати від світла.			
Флуоросфери Stem-Count	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Змішайте вихровим способом			
Для зібраних продуктів аферезу, проб пуповинної крові та проб кісткового мозку: не тримайте їх понад 60 хвилин на льоду, перш ніж проводити аналіз для отримання даних.			
Для проб цільної крові та мобілізованої цільної крові не чекайте більше 45 хвилин на льоду перед збором даних.			
Негайно проаналізуйте розморожені проби.			
Захищати від світла			

Стабільність обробленої проби:

- Для зібраних продуктів аферезу, проб пуповинної крові та проб кісткового мозку після додавання флуоросфер Stem-Count або Flow-Count: не тримайте їх понад 60 хвилин на льоду, перш ніж проводити аналіз для отримання даних.
- Для проб цільної крові та мобілізованої цільної крові після додавання флуоросфер Stem-Count або Flow-Count не чекайте більше 45 хвилин на льоду перед збором даних.
- Для заморожених проб збір даних слід виконувати одразу після додавання флуоросфер Stem-Count або Flow-Count.

- Оброблені проби слід зберігати на льоду, у захищеному від світла місці й максимально обмежити вплив КТ під час збору даних.

ЗМІСТ

Консервант азид натрію може утворювати вибухонебезпечні сполуки в металевих зливних трубопроводах. Див. Бюлетень Національного інституту з охорони праці та промислової гігієни (NIOSH) Explosive Azide Hazard (Вибухонебезпечні азиди) (16.8.76).

Щоб уникнути можливого утворення сполук азиду, промийте зливні труби водою відразу після утилізації нерозведеного реагенту. Реагенти, що містять азид натрію, треба утилізувати з дотриманням відповідних місцевих норм.

ПОТРІБНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ВХОДЯТЬ У КОМПЛЕКТ

1. Деіонізована вода.
2. Збалансований сольовий розчин Хенкса (HBSS) або еквівалентний
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. В якості альтернативи флуоросферам Stem-Count: флуоросфери Flow-Count (Ref. 7547053)
9. Льодова баня
10. Пластикові тестові пробірки (12 x 75 мм)
11. Калібровані піпетки для багаторазового дозування (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) та наконечники або калібровані піпетки з позитивним зміщенням (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) та наконечники
12. Калібрована стандартна піпетка (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) та наконечники.
13. Вортекс-міксер.
14. Таймер.
15. Проточний цитометр.
16. Пакет програмного забезпечення stemCXP 2.0, stemCXP версії 2.0, WIN 7, ТІЛЬКИ для автоматичного аналізу проб на системі проточного цитометра FC 500, оснащений програмним забезпеченням CXP (версія 2.0).

РЕЗУЛЬТАТИ

Налаштування протоколу аналізу

Поточний цитометр повинен бути відповідно оснащений для виявлення прямого розсіювання, бічного розсіювання та чотирьох каналів флуоресценції. Для каналу FL3 (для моніторингу флуоросфер Stem-Count або Flow-Count) використовуйте смуговий фільтр розміром 620 нм. Для каналу FL4 (для моніторингу барвника життєздатних клітин 7-AAD Viability Dye) використовуйте довгохвильовий фільтр розміром 675 нм.

Переконайтесь, що поточний цитометр правильно вирівняний і стандартизований стосовно інтенсивності флуоресценції.

Переконайтесь, що в проточному цитометрі належним чином налаштовано компенсацію флуоресценції.

ПРИМІТКА. Для аналізу зразків всі позиції області є приблизними до кінця збору даних аналізу пробірки 45/34/7-AAD №1. Області оптимізують відповідно до наступного протоколу, а потім HE коригують для другої та третьої пробірки у панелі.

Для аналізу зразків слід дотримуватись серії з 8 гістограм та схеми гейтування (див. нижче). При використанні контрольних клітин CD34+ слід дотримуватись такої ж серії з 8 гістограм та схеми гейтування. Області A, B, C та D (див. заголовок «Створення області» для визначення області) повинні бути адаптовані для включення характерного кластера контрольних клітин CD34+.

Створення гістограм

Створіть гістограми, як зазначено нижче:

1. Створіть гістограму 1 із порівнянням FL1 CD45-FITC та бічного розсіювання.
2. Створіть гістограму 2 із порівнянням FL2 CD34-PE та бічного розсіювання.
3. Створіть гістограму 3 із порівнянням FL1 CD45-FITC та бічного розсіювання.

4. Створіть гістограму 4 із порівнянням прямого розсіювання та бічного розсіювання.
5. Створіть гістограму 5 із порівнянням FL1 CD45-FITC та FL2 CD34-PE.
6. Створіть гістограму 6 із порівнянням прямого розсіювання та бічного розсіювання.
7. Створіть гістограму 7 із порівнянням часу та флуоросфер FL3 Stem-Count або Flow-Count.
8. Створіть гістограму 8 із порівнянням барвника життєздатних клітин FL4 7-AAD та бічного розсіювання.

Гістограми 1-4 призначені для характеристики CD34+ НРС, процесу, який може бути відкладено до етапу аналізу. Ці перші чотири гістограми встановлюються відповідно до рекомендацій ISHAGE для визначення клітин CD34+ за допомогою проточної цитометрії (1, 2). Гістограми 5 – 7 призначені для контролю параметрів, які важливі під час етапу збору даних. До них відносяться дискримінатор прямого розсіювання, кількість подій CD45+, по яким збираються дані, та правильне накопичення одиничних флуоросфер.

Гістограма 8 призначена для розрізнення та аналізу життєздатних подій від нежиттєздатних подій.

Створення областей

Створіть області, як зазначено нижче.

1. Гістограма 1 – Створіть прямолінійну область А на гістограмі 1 з включенням усіх лейкоцитів CD45+ та виключенням тромбоцитів, залишків еритроцитів та агрегатів.
 2. Гістограма 1 – Створіть аморфну область Е на гістограмі 1 з включенням лімфоцитів (яскравий CD45, низький рівень бічного розсіювання).
 3. Гістограма 2 – Створіть прямолінійну область В на гістограмі 2 з включенням усіх подій CD34+. Встановіть значення зупинки підрахунку 75 000 подій (події CD45+) для гістограми 2.
 4. Гістограма 3 – Створіть аморфну область С на гістограмі 3 з включенням усіх подій включених у кластер CD45dim.
 5. Гістограма 4 – Створіть аморфну область D на гістограмі 4, яка містить усі включені в кластери події з середнім бічним розсіюванням та середньовисоким прямим розсіюванням.
 6. Гістограма 5 – Створіть область Quadstat I на гістограмі 5 для перевірки нижньої межі експресії CD45 при подіях CD34+.
 7. Гістограма 5 – Створіть аморфну область Н на гістограмі 5 з оточенням усіх флуоросфер Stem-Count або Flow-Count, включаючи дублети. Область Н повинна бути розташована у верхньому правому куті гістограми 5.
- ПРИМІТКА. Переконайтеся, що область Н позначена як АМОФНА область.
8. Гістограма 5 – Створіть прямолінійну область К (яка називається «listgate—») на гістограмі 5. Встановіть межі області К на першій декаді логарифму гістограми двох параметрів. Ця область К дозволяє виключити подвійні негативні події під час отримання даних, щоб проаналізувати 75 000 відповідних подій CD45+.
 9. Гістограма 6 – Скопіюйте область D з гістограми 4 як область F на гістограмі 6.
 10. Гістограма 7 – Створіть прямолінійну область G на гістограмі 7 з включенням лише одиничних флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count. Область G можна позначити «CAL» для забезпечення автоматичного підрахунку абсолютних чисел CD34+ НРС (більш докладну інформацію див. в посібнику з використання приладу).
 11. Гістограма 8 – Створіть прямолінійну область J на гістограмі 8 з включенням життєздатних лейкоцитів(негативні події барвника життєздатних клітин 7-AAD).

Створення гейтів

Створіть гейти, як зазначено нижче.

1. Гістограма 1 – Призначте «J» для гістограми 1 для відображення усіх життєздатних подій. Якщо 7-AAD не використовується, призначте область «-H» до гістограми 1, щоб відобразити всі події, за винятком усіх флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count, включаючи дублети.
2. Гістограма 2 – Призначте «AJ» («А», якщо 7-AAD не використовується) до гістограми 2 для відображення життєздатних (загальної кількості, якщо 7-AAD не використовується) подій CD34+.
3. Гістограма 3 – Призначте «А», «В» і «J» («А» і «В», якщо 7-AAD не використовується) до гістограми 3 для відображення життєздатних (загальної кількості, якщо 7-AAD не використовується) подій CD45+ / CD34+.
4. Гістограма 4 – Призначте «А», «В», «С» і «J» («А», «В» і «С», якщо 7-AAD не використовується) до гістограми 4 для відображення життєздатних (загальної кількості, якщо 7-AAD не використовується) включених у кластер подій CD45+ / CD34+ з низьким рівнем бічного розсіювання, виключаючи тромбоцити та залишки. Події з області ABCDJ є реальними життєздатними CD34+НРС.
5. Гістограма 5 – Без застосованих гейтів для відображення всіх подій.

6. Гістограма 6 – Віднесіть «ЕJ» («Е», якщо 7-AAD не використовується) до гістограми 6 для відображення життєздатних лімфоцитів (загальної кількості, якщо 7-AAD не використовується) в якості візуальної перевірки дискримінатора.
7. Гістограма 7 – Призначити «H» до гістограми 7, щоб відобразити всі флуоросфери Stem-Count або флуоросфери Flow-Count, включаючи дублети.
8. Гістограма 8 – Призначте «A» для гістограми 8 для відображення подій CD45+.

Налаштування поточної цитометрії

1. Переконайтеся, що проточний цитометр правильно вирівняний і оптимізований для розсіювання світла та інтенсивності флуоресценції детекторів FL1, FL2, FL3 та FL4 відповідно до рекомендацій виробника та лабораторії. Перевірте, чи встановлено компенсацію кольору для стандартної роботи. Детальні інструкції див. у посібнику з використання приладу.
2. Перемішайте вміст пробірок у вортексі протягом 5 секунд.
3. Виконайте збір даних на проточному цитометрі. Необхідно проаналізувати щонайменше 75 000 подій CD45+.
4. Для аналізу зразків: відкоригуйте дискримінатор та області, проаналізувавши пробірку зі зразком 45/34/7-AAD № 1. Збережіть протокол та проаналізуйте пробірки 45/34/7-AAD № 2 та 45/CTRL/7-AAD без подальших коригувань.

Приклад аналізу

Гістограми, наведені в ДОДАТКУ, відображаються у висхідному порядку за номерами, як відображається у протоколі.

Розрахунок CD34+ НРС для зразка

Кількість CD34+ НРС розраховується як середнє значення статистичних результатів області D для зразків у двох повторностях (тобто, 45/34/7-AAD №1 та 45/34/7-AAD №2).

Результати CD34+ НРС вважаються допустимими, якщо результати, отримані з реагентом CD45-FITC / IsoClonic Control-PE, становлять менше 10% від результатів CD34+ НРС.

1. Середні результати, отримані з пробірок 45/34/7-AAD №1 та 45/34/7-AAD №2 для кожного зразка (тобто, середнє значення результати друку статистики області D). Кількість CD34+ НРС може становити 10% від середнього значення для зразків у двох повторностях. Для валідації результатів значення, отримане при аналізі контрольної пробірки 45/CTRL/7-AAD, повинно становити менше 10% від середнього значення, отриманого з тестових пробірок.

ПРИМІТКИ.

Якщо середнє значення для абсолютного числа дублікату CD34+ НРС виходить за межі прийнятого діапазону (тобто, перевищує 10%), визначте, чи правильно виконано піпетування, особливо для флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count. Візуально перевірте протоколи проточного цитометра та якість процесів фарбування та лізису у ваших тестових пробірках. Перевірте, як встановлені межі області.

Якщо значення, отримане з 45/CTRL/7-AAD, виходить за межі діапазону прийнятих значень (тобто, перевищує 10% від середнього значення абсолютного числа, отриманого для дублікату), визначте, чи правильно було виконано піпетування, особливо для флуоросфер Stem-Count або флуоросфер Flow-Count. Візуально перевірте протоколи проточного цитометра та якість процесів фарбування та лізису у ваших тестових пробірках. Перевірте, як встановлені межі області.

При необхідності повторіть крок збору даних з додаванням пробірки з ХОЛОСТОЮ ПРОБОЮ після першої подвійної пробірки 45/34/7-AAD №1 та №2 та перед пробіркою 45/CTRL/7-AAD. При необхідності повторіть увесь етап підготовки з новими тестовими пробірками, додавши пробірку з ХОЛОСТОЮ ПРОБОЮ. Зберіть дані та проаналізуйте як нову, так і попередню серію пробірок. Порівняйте два результати. Якщо немає узгодження, зверніться до місцевого представника компанії Beckman Coulter.

2. Якщо зразок було розбавлено, результат, отриманий вище, ПОВИНЕН бути помножений на відповідний коефіцієнт розведення (Dil). Отриманий кінцевий результат являє собою абсолютне число CD34+ НРС (клітин/мкл).

Абсолютне число CD34+ НРС (клітин/мкл) = Результат друку абсолютного числа CD34+ НРС (клітин/мкл) x Dil

3. Для упаковок з продуктами аферезу загальну кількість CD34+ НРС на упаковку можна розрахувати за наступною формулою:

Загальна кількість CD34+ НРС на упаковку = Абсолютне число CD34+ НРС (клітин/мкл) x 10⁶ x Об'єм упаковки (л)

Де:

4. Для розрахунку відсоткового значення CD34+ НРС в рамках розрахунку значення лейкоцитів CD45+, використовуйте наступну формулу:

$$\% \text{ CD34+ НРС} = \frac{\text{Абсолютне число CD34+ НРС (клітин/мкл)} \times 100}{\text{Абсолютне число лейкоцитів CD45+ (клітин/мкл)}} \quad \text{(тобто, результати друку області D)} \quad \text{(тобто, результати друку області A)}$$

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Переконайтесь, що проточний цитометр правильно вирівняний відповідно до рекомендацій виробника, як зазначено в посібниках з використання приладів. Цільова інтенсивність була встановлена для оптимізації параметрів розсіювання світла та флуоресценції приладу для аналізу зразків, забарвлених реагентом моноклонального антитіла CD45-FITC / CD34-PE та реагентом CD45-FITC / Isoclonic Control-PE.

Флуорохроми з флуоресцеїну ізотіоціанатом (FITC), фікоеритрином (PE) та барвником 7-аміно-актиноміцину D (7-AAD) виділяються при різних довжинах хвиль, але вони мають деяке спектральне перекриття, яке необхідно скоригувати електронною компенсацією. Оптимальні рівні компенсації можна встановити шляхом аналізу, на двохпараметричній гістограмі, зразка цільної крові, до якого додають контрольні клітини Stem-Trol Control Cells, забарвлені барвником життєздатних клітин 7-AAD і відповідними компенсаційними реагентами при використанні програмного забезпечення CXP. У цьому аналізі проводяться коригування для забезпечення відсутності забарвлення в двоколірному квадранті будь-яким окремим флуорохромом.

Барвник життєздатних клітин 7-AAD (7-аміно-актиноміцин D) використовується для ідентифікації нежиттєздатних клітин за допомогою проточного цитометричного аналізу, що дозволяє перерахувати досліджувані життєздатні клітини. Барвник поглинається мертвими клітинами (яскраві події), які потім виключаються з життєздатних клітин (негативні події) шляхом гейтування (див. Гістограму 8).

Перед тим як проаналізувати зразки, слід провести фарбування досліджуваного контролю (контрольні клітини Stem-Trol) для перевірки реактивності антитіл.

ЕФЕКТИВНІСТЬ

Наведені технічні характеристики базуються на реагентах Stem-Kit, що використовуються з проточним цитометром COULTER EPICS XL/XL-MCL з програмним забезпеченням System II. Приклади технічних характеристик на FC 500 з програмним забезпеченням CXP див. у посібнику з використання системи stemCXP.

Очікувані значення для еталонних діапазонів

Нормальні зразки крові (n = 117) були відібрані у популяції чоловіків (n = 58) та жінок (n = 59) для встановлення нормального контрольного діапазону. Це дослідження було виконано у дослідницькому центрі зовнішнього оцінювання. Повторні тести для кожного зразка були підготовлені відповідно до Інструкції з використання реагентів Stem-Kit. Ручне гейтування та аналіз проводили для отримання значень CD45+, CD34+ та CD34%.

Статистичний аналіз передбачає негаусівський розподіл зібраних даних. На підставі цих висновків для аналізу даних використовувався непараметричний (надійний) підхід. Були отримані значення CD45+, CD34+ та CD34%. Значення виражаються у абсолютних числах (клітин/мкл) для CD45+ і CD34+ та відсотка від загального числа лейкоцитів (CD34%), як показано в таблиці нижче.

Нормальна цільна кров: еталонні діапазони

Ручний метод (надійний аналіз)	n	CD45+ (клітин/мкл)				CD34+ (клітин/мкл)				CD34+ (%)			
		Мін.	Макс.	Середнє	СВ значення	Мін.	Макс.	Середнє	СВ значення	Мін.	Макс.	Середнє	СВ значення
Вручну	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Ці значення призначені лише для репрезентативних цілей. Кожна лабораторія має встановити власний діапазон очікуваних значень серед місцевої популяції здорових донорів.

Лінійність

Повторні вимірювання проводились при кожному з 10 серійних розведень для 2 типів зразків: периферична цільна кров з додаванням CD34+ та свіжа мобілізована периферична цільна кров. Динамічний діапазон від 0 до 2000 клітин/мкл та нижній діапазон чутливості від 0 до 150 клітин/мкл були досягнуті для концентрацій CD34+ НРС. Зразки готували відповідно до Інструкції з використання реагентів Stem-Kit і аналізували на проточному цитометрі COULTER EPICS XL/XL-MCL. Значення виражаються в абсолютних числах (клітин/мкл). Результати аналізували на предмет лінійного регресійного аналізу для очікуваного та відновленого абсолютного числа середнього значення повторностей менш ендогенних клітин CD34+. Див. таблиці наведені нижче.

Нахили ліній регресії, наведені на графіках абсолютного числа загального CD34+ НРС, показують математичну міру лінійності. Це підтверджується мінімальним потенційним зміщенням аналізу, про що свідчать точки у-перетину для аналізів. Очікувані абсолютні числа демонструють високу кореляцію з відновленими абсолютними числами.

Результати CD34+ доданої цільної крові

Графік див. у Додатку.

Результати аналізу периферичної (мобілізованої) крові

Графік див. у Додатку.

Точність методу (таблиці) (очікувані результати у порівнянні з відновленими)

Точність методу визначається як ступінь узгодження між очікуваними та відновленими результатами як для ручного, так і для автоматизованого методів гейтування та аналізу. Свіжа нормальна периферична цільна кров була додана з очищеними клітинами CD34+ до рівня 1875 клітин/мкл. Кількості клітин були підтверджені гемоцитометром Malassez та серійно розведені до різних концентрацій. Очікувані результати порівнюються з відновленими результатами на предмет середнього значення вимірювань у двох повторностях з використанням автоматичного та ручного гейтування та аналізу для кожного рівня розведення. Тестування на нахил та ординати у точці перетину не демонструють статистичної різниці між автоматичним гейтуванням, аналізом та очікуваними результатами, а також між ручним гейтуванням, аналізом та очікуваними результатами.

Точність методу - CD34+ (%)

Графік див. у Додатку.

Точність методу - Абсолютне число CD34+ (клітин/мкл)

Графік див. у Додатку.

Точність методу – Загальна кількість лейкоцитів - CD45+ (клітин/мкл)

Графік див. у Додатку.

Точність методу (результати автоматичного методу в порівнянні з ручним)

Ступінь точності між автоматизованим та ручним методами системи stemONE вивчали у чотирьох дослідницьких центрах зовнішнього оцінювання з використанням свіжої периферичної цільної крові та свіжих або розморожених аферезів, зразків пуповинної крові та кісткового мозку. Довірчі інтервали (ДІ) розраховували з 95%-ми межами.

Зразки свіжої периферичної цільної крові (n = 59 з трьох дослідницьких центрів), свіжих продуктів аферезу (n = 51 з трьох дослідницьких центрів), свіжої пуповинної крові (n = 29 з двох дослідницьких центрів), свіжого кісткового мозку (n = 33 з двох дослідницьких центрів), розморожених продуктів аферезу (n = 23 з одного дослідницького центру), розмороженої пуповинної крові (n = 31 з двох дослідницьких центрів) та розмороженого кісткового мозку (n = 20 з одного дослідницького центру) були підготовлені відповідно до Інструкції з використання реагентів Stem-Kit та проаналізовані на проточних цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL. Автоматичне та ручне гейтування та аналіз проводили для отримання значень CD45+, CD34+ та CD34%.

Точність методів (Рисунки)

Зразки свіжої периферичної цільної крові (n = 59)

Графік див. у Додатку.

Зразки свіжого аферезу (n = 51)

Графік див. у Додатку.

Зразки свіжої пуповинної крові (n = 29)

Графік див. у Додатку.

Зразки свіжого кісткового мозку (n = 33)

Графік див. у Додатку.

Розморожені зразки аферезу (n = 23)

Графік див. у Додатку.

Розморожені зразки пуповинної крові (n = 31)

Графік див. у Додатку.

Зразки розмороженого кісткового мозку (n = 20)

Графік див. у Додатку.

Прецизійність

Міжлабораторна прецизійність

Дослідження проводилися в межах однієї клінічної установи трьома операторами, кожен з яких використовував інший проточний цитометр. Було виявлено три зразки, що представляють динамічний діапазон CD34+ (0–2000 клітин/мкл):

Низький діапазон:	свіжа, мобілізована периферична кров
Середній діапазон:	продукт аферезу
Високий діапазон:	продукт аферезу

Ці зразки були розподілені на три аліквоти, кожному з трьох операторів було надано одну аліквоту кожного рівня (низький, середній, високий). Зразки готували ($n = 10$) з кожної аліквоти відповідно до Інструкції з використання реагенту Stem-Kit. Кожен оператор виконував аналіз на поточному цитометрі EPICS XL, використовуючи автоматичне і ручне гейтування та аналіз для отримання значень CD45+, CD34+ та CD34%. Значення виражаються у відсотках (%) від загальної кількості лейкоцитів і в абсолютних числах (клітин/мкл).

Результати дослідження міжлабораторної прецизійності за рівнем, наведені в таблицях нижче. Значення, отримані для абсолютних чисел CD45+ і CD34+ та процентні значення CD34 показують незначну варіацію, про яку свідчать середні значення, стандартні відхилення та коефіцієнти варіації повторних вимірювань.

Графік див. у Додатку.

Внутрішньолaborаторна прецизійність

Зразки, що охоплюють динамічний діапазон аналізу, були отримані з використанням свіжої периферичної цільної крові, свіжого кісткового мозку та свіжого та розмороженого зразків: аферезу та пуповинної крові з чотирьох зовнішніх дослідницьких центрів зовнішнього оцінювання. Десять зразків з кожного готували відповідно до Інструкції з використання реагентів Stem-Kit та аналізували на проточних цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL, використовуючи ручне гейтування та аналіз для отримання значень CD45+, CD34+ та CD34%.

Значення CD45+, CD34+ та CD34%, наведені у наступних таблицях, показують, що метод аналізу відтворюється, про що свідчать середні значення, стандартні відхилення та коефіцієнти варіації для цих вимірювань. Таблиці даних, показані в ДОДАТКУ, демонструють міжлабораторну прецизійність аналізу.

Графік див. у Додатку.

ОБМЕЖЕННЯ

Для отримання інформації щодо обмежень при використанні автоматизованого способу зверніться до stemCXP System Guide (посібника з використання системи stemCXP), наданого з програмним забезпеченням системи stemCXP.

- Забарвлені та пролізовані проби слід зберігати на льоду та аналізувати на проточному цитометрі відповідно до інформації, наведеної в розділі «Стабільність обробленої проби», інакше можуть виникнути помилкові результати.
- Не розбавляйте, не відбирайте аліквоти та не заморожуйте реагенти. Використовуйте тільки так, як надається в упаковці.
- Реагенти призначені лише для використання у проточній цитометрії.
- Правильно розморозити заморожені зразки, щоб забезпечити оптимальне фарбування.
- Усі еритроцити можуть не лізуватися за наступних умов: наявність ядровмісних еритроцитів, аномальна концентрація білка або гемоглобінопатії. Це може призвести до хибного зниження результатів CD34% через те, що еритроцити, які не пройшли лізис, можуть бути підраховані як лейкоцити. На абсолютні числа CD34+ і CD45+ не має бути впливу.
- У деяких пацієнтів можуть виявлятися особливі проблеми через зміни або дуже низьку кількість певних клітинних популяцій.
- Результати, отримані при поточній цитометрії, можуть бути помилковими, якщо гейти неправильно встановлені.
- Реагенти Stem-Kit призначені для використання барвника життєздатних клітин 7-AAD для визначення життєздатних клітин HPC. Якщо ваша лабораторія використовує альтернативний метод визначення життєздатності, дотримуйтеся загальних стандартів належної лабораторної практики та процедур контролю якості вашої лабораторії для забезпечення якості реєстрованих результатів.

ТОРГОВЕЛЬНІ МАРКИ

Beckman Coulter, стилізований логотип, товарні знаки й сервісні марки Beckman Coulter, вказані тут, є торговельними марками або зареєстрованими торговельними марками компанії Beckman Coulter, Inc. у Сполучених Штатах Америки й інших країнах.

ДОДАТКОВА ІНФОРМАЦІЯ

www.beckmancoulter.com

Список символів

Глосарій символів доступний на сайті beckman.com/techdocs (документ № B60062)

Reagentes Stem-Kit

REF IM3630 50 testes

Para uso em diagnóstico *in vitro*

USO PREVISTO

Os reagentes do kit Stem são compostos por um reagente de anticorpo monoclonal murino fluorescente bicolor (FITC, PE), um controle isoclônico murino fluorescente bicolor (FITC, PE), um reagente de contagem absoluta, um reagente de viabilidade celular e um reagente de lise. Ele é destinado ao “uso em diagnóstico *in vitro*” para a identificação e enumeração simultâneas das porcentagens de populações de células CD45+ e CD45+ e CD34+ (duplamente positivas) e contagens absolutas em espécimes biológicos por citometria de fluxo. Os espécimes biológicos incluem sangue total periférico normal ou mobilizado fresco, produtos de aférese frescos ou descongelados, sangue do cordão umbilical e medula óssea. As medições da população celular podem ser obtidas usando um método automatizado ou um método manual para a delimitação e a análise.

Consulte o folheto informativo dos reagentes Stem-Kit para obter instruções completas caso esteja usando o método manual. Consulte o stemCXP System Guide (Guia do sistema stemCXP) fornecido com o kit do software stemCXP 2.0 e do stemCXP versão 2.0, WIN 7 para obter instruções completas se estiver usando o método automatizado.

SUMÁRIO

Células progenitoras hematopoéticas (Hematopoietic Progenitor Cells, HPC)

Os reagentes do kit Stem são projetados para identificar as células progenitoras hematopoéticas (hematopoietic progenitor cells, HPC) humanas usando os seguintes critérios: “Células CD34+ verdadeiras (a) expressam o antígeno CD34, (b) expressam o antígeno CD45 com intensidade de coloração característica das células blásticas (ou seja, prontamente detectável, mas em níveis inferiores aos linfócitos e monócitos) e (c) exibem dispersão de luz de ângulo lateral baixo e ângulo frontal baixo a intermediário característica das células de explosão” (1). A exclusão de HPC CD34+ mortas da contagem de HPC CD34+ viáveis é obtida usando o corante de viabilidade 7-AAD (2).

CD34

O antígeno CD34 é uma família de glicoproteínas de cadeia simples transmembranares do tipo I diferencialmente glicosiladas (3, 4, 5). Ele é expresso em praticamente todas as células precursoras hematopoéticas, incluindo células-tronco multipotentes. Os epítomos de CD34 foram separados em três classes com base na sensibilidade à neuraminidase e à glicoprotease de *Pasteurella haemolytica* (6). O anticorpo monoclonal CD34 (mAb) utilizado nos reagentes do kit Stem é denominado 581. Ele reconhece especificamente um epítipo classe III da molécula CD34 (7) conforme definido por padrões de clivagem enzimática (6, 8). Este anticorpo monoclonal 581 foi atribuído ao CD34 durante o 5º HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (Workshop sobre HLDA — antígenos de diferenciação de leucócitos humanos) realizado em Boston, Massachusetts, EUA, em 1993 (7).

CD45

O anticorpo CD45 reconhece os membros da família de antígenos pan-leucócitos CD45 com peso molecular de 180, 190, 210 e 220 kD (9, 10, 11). Ele é também conhecido como o antígeno comum de leucócitos (leukocyte common antigen, LCA). O antígeno CD45 se expressa em todos os tipos de células hematopoéticas, exceto nos eritrócitos maduros e suas células progenitoras imediatas (11, 12). Não foi detectado no tecido não hematopoético diferenciado (12, 13, 14, 15). O mAb (anticorpo monoclonal) CD45 usado nos reagentes do kit Stem é chamado J33. Ele foi atribuído ao CD45 durante o 3º HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (Workshop sobre HLDA — antígenos de diferenciação de leucócitos humanos), realizado em Oxford, na Inglaterra, em 1986 (16).

7-AAD

O corante de viabilidade 7-amino-actinomicina D (7-AAD) é um análogo da actinomicina D que contém um grupo amino substituído na posição 7 do cromóforo. O corante de viabilidade 7-AAD se intercala entre as bases citosina e guanina do DNA (15). As actinomicinas são compostos biologicamente ativos que contém um cromóforo 2-amino-4, 6 dimetilfenoxazona-3 e dois pentapeptídeos cíclicos (17). As actinomicinas formam complexos estáveis com o ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla (DNA), mas não com o ácido ribonucleico de cadeia dupla (RNA) nem com os híbridos RNA-RNA ou com DNA ou RNA de cadeia simples (15, 18).

As propriedades espectrais do corante de viabilidade 7-AAD tornam esta molécula particularmente adequada para a análise por citometria de fluxo (17). A absorção máxima do complexo 7-AAD/DNA está situada na região espectral verde e, portanto, é adequada para um citômetro equipado com laser de argônio (comprimento de onda de excitação de 488 nm) (15). A emissão de fluorescência em vermelho escuro do corante de viabilidade 7-AAD (635 a 675 nm) facilita a utilização desta sonda em combinação com anticorpos conjugados de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE), porque, em contraste com o iodeto de propídio (PI), o complexo 7-AAD/DNA exibe sobreposição espectral mínima com FITC e PE (17).

As células apoptóticas, necróticas e/ou danificadas são fontes de interferência na análise de células viáveis por citometria de fluxo. As células não viáveis devem ser avaliadas e discriminadas focalizando a coloração positiva de 7-AAD quando as células viáveis permanecem não coradas (negativas) (19).

Sistemas de citômetro de fluxo

Os sistemas de citômetro de fluxo (FC 500) aplicam os princípios da citometria de fluxo para analisar espécimes biológicos para identificar várias populações de células determinadas pelos fluorocromos e anticorpos monoclonais específicos usados. O presente teste usa os sistemas de citômetro de fluxo FC 500 equipados com o software do sistema CXP para analisar amostras.

PRINCÍPIO

Esse teste depende da capacidade de um anticorpo monoclonal para se ligar à superfície das células que expressam determinantes antigênicos discretos. O reagente CD45-FITC/CD34-PE nos reagentes do kit Stem é uma combinação de dois anticorpos monoclonais murinos; cada um conjugado com um fluorocromo específico e específico para um antígeno de superfície celular diferente. A coloração específica da superfície celular é realizada incubando amostras duplicadas de um espécime biológico com o reagente CD45-FITC/CD34-PE bicolor.

Um teste adicional da mesma amostra é corado com o reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE para verificar a ligação não específica do anticorpo monoclonal CD34-PE. O corante de viabilidade 7-AAD, um corante de ácido nucleico que se liga a pares de bases acessíveis (DNA celular), é usado para distinguir entre células viáveis e não viáveis. As hemácias em cada amostra são lisadas com a solução de lise com NH₄Cl preparada a 1x. As fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count (o reagente de contagem absoluta) são adicionadas, e as células remanescentes são analisadas por citometria de fluxo. O controle de processo e o controle de qualidade para o ensaio são fornecidos pelo instrumento e pelos reagentes de controle de qualidade da amostra: fluoroesferas Flow-Check, fluoroesferas Flow-Set, reagentes de compensação adequados e células de controle Stem-Trol.

EXEMPLOS DE APLICAÇÕES CLÍNICAS

Uma cronologia dos relatórios científicos das células progenitoras hematopoiéticas (HPC) mostra que os estudos iniciais se basearam na contagem de células nucleadas para quantificação. Os estudos subsequentes envolvendo ensaios de unidade formadora de colônias (UFC) forneceram aproximações aproximadas das populações de células progenitoras. Os ensaios de UFC intensivos temporizados foram acompanhados pela descoberta da molécula de superfície celular CD34. Descobriu-se que CD34 está presente na superfície de células hematopoiéticas precoces e células formadoras de colônias hematopoiéticas na medula óssea e no sangue periférico (20). Então, anticorpos monoclonais dirigidos contra a molécula CD34 foram desenvolvidos e utilizados na citometria de fluxo. Atualmente, as determinações de CD34 por citometria de fluxo são amplamente aceitas como um meio para avaliar células-tronco e células progenitoras hematopoiéticas.

Na medula óssea de indivíduos normais, 1% a 3% das células que expressam o antígeno CD34 são capazes de reconstituir hematopoiese de múltiplas linhagens de longo prazo (3, 20). No sangue periférico de indivíduos normais, menos de 0,1% das células circulantes expressam o antígeno CD34 (1, 21). O uso dos reagentes do kit Stem fornece um método de citometria de fluxo simples, rápido e sensível para enumerar células progenitoras e células-tronco hematopoiéticas em sangue periférico, produtos de leucopeseis, medula óssea e sangue do cordão umbilical.

CONSTITUIÇÃO DO REAGENTE

Os reagentes do kit Stem contêm:

- Reagente CD45-FITC/CD34-PE (45/34) – 1 frasco.
- Reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE (45/CTRL) – 1 frasco.
- Fluoroesferas Stem-Count — 1 frasco.
- Corante de viabilidade 7-AAD — 1 frasco.
- Solução de lise com NH₄Cl 10x — 2 frascos.

1. Esses reagentes devem ser usados como um conjunto, conforme fornecido no kit.

As fluoroesferas Flow-Count, que são equivalentes às fluoroesferas Stem-Count, podem ser usadas para a determinação da contagem absoluta se estiver usando a concentração específica testada.

2. O CD45-FITC/CD34-PE é um reagente bicolor pronto para o uso fornecido em 2,2 mL de soro fisiológico tamponado com fosfato (phosphate-buffered saline, PBS) contendo 2 mg/mL de albumina de soro bovino (bovine serum albumin, BSA) e 0,1% de azida sódica como conservante.
3. CD45-FITC/IsoClonic Control-PE é um reagente bicolor pronto para o uso fornecido em 1,2 mL de PBS contendo 2 mg/mL de BSA e 0,1% de azida sódica como conservante. O reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE é uma mistura de anticorpos monoclonais 581 não conjugados e conjugados com PE (idêntico a CD34). Esta mistura atua como um controle isomorfológico adequado para verificar a ligação não específica de mAb CD34-PE em cada amostra.

OBSERVAÇÃO: Os reagentes CD45-FITC/CD34-PE e CD45-FITC/IsoClonic Control-PE não devem ser separados. Ao realizar os testes e controles, é preciso verificar atentamente que ambos os reagentes tenham o mesmo número de lote no rótulo do frasco.

Sumário das características dos anticorpos

Especificidade	CD45	CD34
Clone	J33	581
Hibridoma	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Imunógeno	Linhagem de células LAZ 221 ALL humanas	Linhagem de células KG-1a humanas
Cadeia de Ig	IgG1, cadeias leves κ	IgG1, cadeias leves κ
Espécie	Camundongo	Camundongo
Conjugação	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	R-ficoeritrina (PE)
Razão molar	5–8 moles FITC/mole Ig	0,5–1,5 moles PE/mole Ig
Comprimento de onda de excitação	488 nM (azul esverdeado)	488 nM (azul esverdeado)
Emissão de fluorescência	504 a 541 nm (principalmente verde)	568 a 590 nm (principalmente laranja)

- As fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count são compostas por microesferas fluorescentes de poliestireno de 10 µm (diâmetro nominal) em um meio de suspensão aquoso de 20 mL contendo um surfactante e 1% de formaldeído. Cada fluoroesfera contém um corante que tem um intervalo de emissão de fluorescência de 525 nm a 700 nm quando excitado a 488 nm. A concentração testada (fluoroesferas/µL) das fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count é derivada de múltiplas análises replicadas utilizando um analisador de tamanho de partícula COULTER. O valor específico do lote está indicado no rótulo do frasco.
- O corante de viabilidade 7-AAD é fornecido em 99% de soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS: fosfato de sódio 0,01 M, cloreto de sódio 0,145 M, pH 7,2) mais 1% de dimetilsulfóxido (DMSO).
- A solução de lise com NH₄Cl é fornecida como uma solução 10x concentrada de 20 mL. Ela contém uma mistura de cloreto de amônio (NH₄Cl), bicarbonato de potássio (KHCO₂), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

AVISOS E PRECAUÇÕES

- As preparações de anticorpo monoclonal contêm 0,1% de azida sódica. Azida sódica, em condições ácidas, produz ácido hidrazoico, um composto extremamente tóxico. A eliminação em sistemas de esgoto deve ser acompanhada por grandes quantidades de água corrente para evitar o acúmulo perigoso em tubulações metálicas e potenciais explosões.
- Os espécimes, as amostras e todo material em contato com os mesmos devem ser tratados como suscetíveis de transmitir infecções, e devem ser descartados com as devidas precauções.
- Nunca efetue a pipetagem com a boca, e evite o contato das amostras e reagentes com a pele e as membranas mucosas.
- Não use reagentes fora do prazo de validade impresso no rótulo do frasco.
- As fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count contêm 1% de formaldeído. Evite o contato com a pele e os olhos, pois o formaldeído pode causar efeitos irreversíveis sobre esses tecidos. Não inale os vapores. Use equipamentos de segurança adequados, como luvas e proteção para os olhos.
- Não exponha os reagentes do kit Stem ao calor ou à luz forte durante o armazenamento ou o uso.
- Evite a evaporação e o vazamento das fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count, ou podem ocorrer resultados errados. Tampe firmemente os frascos após o uso e armazene-os na posição vertical.
- Certifique-se de que as fluoroesferas estão completamente ressuspensas antes da utilização. Evite a mistura excessiva para minimizar a formação de bolhas de ar. Não pipete bolhas de ar ou resultados errôneos podem ocorrer.
- Use uma pipeta calibrada (preferencialmente as pipetas de deslocamento positivo ou de repetição) para dispensar as amostras e as fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count, ou podem ocorrer resultados errados.
- Utilize as técnicas de pipetagem recomendadas pelo fabricante da pipeta para garantir a pipetagem exata e precisa das amostras e fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count, ou podem ocorrer resultados errados.
- As amostras coradas e lisadas devem ser armazenadas no gelo e analisadas no citômetro de fluxo de acordo com as informações na seção “Estabilidade de amostras processadas”; caso contrário, podem ocorrer resultados errôneos.
- Certifique-se de contar pelo menos 1.000 fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count, ou a conversão automática dos resultados para contagens absolutas não ocorrerá.
- Cada lote de fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count tem uma concentração específica de fluoroesferas. Certifique-se de usar a concentração testada correta para determinar os resultados de contagem absoluta.
- Os métodos de preparação que requerem uma etapa de lavagem não devem ser usados devido à perda desconhecida de células.
- O uso de tempos de incubação ou mistura ou de temperaturas diferentes daqueles especificados poderá dar origem a resultados errados.

16. O corante de viabilidade 7-AAD contém 0,005% de 7-AAD. O 7-AAD puro é um potencial carcinogênico. Embora este composto esteja altamente diluído, recomendamos evitar o contato com a pele e os olhos, usar roupas e luvas de proteção adequadas e proteção apropriada para os olhos/rosto.
17. O corante de viabilidade 7-AAD contém 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). O DMSO puro é um irritante. Embora este composto esteja diluído, recomendamos evitar o contato com a pele e os olhos, usar roupas e luvas de proteção adequadas e proteção apropriada para os olhos/rosto.
18. Como um cromóforo, o 7-AAD é sensível à luz. Armazene o corante de viabilidade 7-AAD na caixa de papelão do kit para evitar a exposição contínua à luz durante o armazenamento.
19. Minimize a exposição de amostras misturadas à luz durante a incubação.
20. Use boas práticas de laboratório ao manusear os reagentes.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO DO GHS

Fluoresferas Stem-Count

PERIGO



H316

Provoca irritação moderada à pele.

H317

Pode provocar reações alérgicas na pele.

H350

Pode provocar câncer.

P201

Obtenha instruções específicas antes do uso.

P280

Use luvas de proteção, roupa de proteção e proteção ocular/facial.

P308+P313

Em caso de exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

P333+P313

Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.

P362+P364

Retire toda a roupa contaminada e lave-a antes de usá-la novamente.

Formaldeído 0,5 - 1,0%

massa reacional de:

5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona

[CE nº 247-500-7] e

2-metil-4-isotiazolina-3-ona [CE

nº 220-239-6] (3:1) < 0,05%

Corante 7-AAD para verificação de viabilidade AVISO

H316

Provoca irritação moderada à pele.

P332+P313

Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Dimetilsulfóxido 0,5 - 2%



A Folha de dados de segurança está disponível em beckman.com/techdocs

CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE

O reagente não violado é estável até a data de validade indicada no frasco quando armazenado entre 2°C–8°C na ausência de luz. Não use após a data de validade. Não congele. Os reagentes do kit Stem são estáveis por 30 dias após a abertura do frasco de fluoresferas Stem-Count ou fluoresferas Flow-Count. Os frascos abertos devem ser tampados imediatamente após o uso e armazenados entre 2°C–8°C na ausência de luz. NÃO retire alíquotas de fluoresferas Stem-Count ou fluoresferas Flow-Count do seu frasco original.

IMPORTANTE: Há o risco de ocorrer resultados errados se houver vazamento das fluoresferas Stem-Count ou fluoresferas Flow-Count. Uma vez abertas, as fluoresferas Stem-Count ou fluoresferas Flow-Count devem ser armazenadas na posição vertical para evitar a possibilidade de vazamento. Os reagentes não devem ser utilizados se forem observados sinais de vazamento.

Evidência de deterioração

As seguintes situações podem indicar evidência de deterioração:

Reagentes do kit Stem, exceto fluoroesferas Stem-Count

- Uma alteração na aparência normal conforme listada abaixo

Reagente	Aparência normal
CD45-FITC/CD34-PE	Líquido transparente com uma cor levemente rosa
CD45-FITC/IsoClonic Control-PE	Líquido transparente a uma cor levemente rosa
Corante 7-AAD para verificação de viabilidade	Líquido transparente com uma cor levemente rosa à avermelhada
Solução de lise com NH_4Cl	Líquido transparente, incolor

Fluoroesferas Stem-Count

- Surgimento, durante a aquisição, de populações fluorescentes secundárias contendo mais de 20% da população total de fluoroesferas.
- Uma grande variação nos valores obtidos para as contagens ou amostras.

IMPORTANTE: Os reagentes não devem ser utilizados se houver evidência de deterioração, pois podem ser obtidos resultados incorretos. Ligue para seu representante local da Beckman Coulter se houver evidência de deterioração.

Preparação do reagente

1. Os reagentes bicolores CD45-FITC/CD34-PE e CD45-FITC/IsoClonic Control-PE são usados diretamente dos frascos sem qualquer diluição.
2. As fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count são usadas diretamente do frasco para injetáveis sem qualquer diluição. O lacre de alumínio da vedação térmica deve ser removido da parte superior do frasco quando ele é aberto pela primeira vez. São necessárias misturas adequadas. Ao manusear pela primeira vez as fluoroesferas Stem-Count ou as fluoroesferas Flow-Count no início do dia, coloque-as no vórtex por 3–5 segundos.

Antes de realizar a pipetagem, agite o frasco suavemente com 3–5 inversões.

Após o vórtex inicial no início do dia, refrigere o frasco de fluoroesferas novamente a 2°C–8°C até o uso.

Evite a evaporação e o vazamento tampando firmemente o frasco após o uso.

3. O corante de viabilidade 7-AAD é usado diretamente do frasco para injetáveis sem qualquer diluição.
4. Uma solução de lise com NH_4Cl 1x deve ser preparada diariamente: adicione nove volumes de água deionizada a um volume de solução de lise com NH_4Cl concentrada a 10x. Não refrigere. Descarte a solução de lise com NH_4Cl 1x não utilizada no fim do dia.

Coloque todos os reagentes à temperatura ambiente (18°C–25°C) antes do uso.

MANUSEIO DE AMOSTRAS

Requisitos dos espécimes

Resumo sobre o manuseio de espécimes:

Tipo de amostra	Método de delimitação	Temperatura de armazenamento	Idade do espécime
Aférese	Algoritmo	2–8°C	24 horas
	Manual	2–8°C	24 horas
Medula óssea	Algoritmo	2–8°C	24 horas
	Manual	2–8°C	24 horas
Sangue do cordão umbilical	Algoritmo	18–25°C	24 horas
	Manual	18–25°C	24 horas
Sangue total normal	Algoritmo	18–25°C	20 horas
	Manual	18–25°C	20 horas
Sangue total mobilizado	Algoritmo	18–25°C	20 horas
	Manual	18–25°C	20 horas

1. Os espécimes biológicos incluem sangue fresco total periférico normal ou mobilizado, produtos de aférese frescos ou descongelados, sangue do cordão umbilical e medula óssea.
2. As células progenitoras hematopoiéticas (HPC) purificadas ou manipuladas podem ser analisadas apenas com o método de delimitação manual.
3. Colete produtos de aférese, amostras de sangue periférico, amostras de sangue do cordão umbilical ou amostras de medula óssea assepticamente em um tubo de coleta de sangue evacuado estéril com anticoagulante ADC de fórmula A ou com anticoagulante K3 EDTA.
4. As amostras de sangue total e de sangue total mobilizado coletadas em tubos com anticoagulante podem ser armazenadas antes da coloração por até 20 horas à temperatura ambiente (18–25°C).
5. As amostras de sangue do cordão umbilical coletados em tubos com anticoagulante podem ser armazenadas antes da coloração por até 24 horas à temperatura ambiente (18–25°C).
6. Os produtos de aférese e espécimes de medula óssea coletados podem ser armazenados entre 2–8°C por até 24 horas antes da coloração.
7. Antes da preparação da amostra, verifique se a concentração de glóbulos brancos (WBC) não é superior a 30×10^9 células WBC/L. Se necessário, dilua a amostra com HBSS ou equivalente para alcançar o valor médio de 15×10^9 células WBC/L. Registre o fator de diluição para o cálculo da contagem absoluta de HPC final.
8. Baixas concentrações proteicas podem causar a aglomeração das fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count e fornecer contagens absolutas de células erroneamente altas. A diluição de espécimes com baixa concentração proteica deve ser realizada usando um tampão enriquecido em proteína.
9. Todos os espécimes devem ser processados com reagentes do kit Stem, incluindo o corante de viabilidade 7-AAD.

Procedimento para o processamento de espécimes

Execute testes duplicados seguindo as “The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry” (“Diretrizes ISHAGE para a determinação de células CD34+ por citometria de fluxo”) (1).

OBSERVAÇÃO: Para o processamento das células de controle Stem-Trol, consulte as instruções incluídas na embalagem das células de controle Stem-Trol para obter instruções completas, caso esteja usando o método manual. Consulte o Guia do sistema stemONE fornecido com o software do sistema stemONE ou o Guia do sistema stemCXP fornecido com o software do sistema stemCXP para obter instruções completas, caso esteja usando o método de análise automatizada.

1. Para cada amostra de espécime, rotule três tubos da seguinte maneira:
 - 45/34/7-AAD nº 1
 - 45/34/7-AAD nº 2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipete 20 µL do reagente CD45-FITC/CD34-PE nos tubos: 45/34/7-AAD nº 1 e 45/34/7-AAD nº 2.
3. Pipete 20 µL do reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE no tubo: 45/CTRL/7-AAD.
4. Pipete 20 µL do corante de viabilidade 7-AAD em todos os tubos.

IMPORTANTE: Há o risco de lise incompleta se o espécime de sangue permanecer na parte superior ou lateral do tubo de teste. Tenha cuidado durante a pipetagem para evitar que o sangue toque o a parte superior ou a lateral do tubo de teste. Limpe o tubo com um swab, se necessário, para remover todos os vestígios de amostras de sangue da parte superior ou lateral do tubo de teste.

5. Usando uma pipeta de deslocamento positivo ou uma pipeta de repetição, pipete 100 µL da amostra do paciente no tubo.
6. Imediatamente coloque o tubo no vórtex por 5 segundos.
7. Incube todos os tubos à temperatura ambiente (18°C–25°C) durante 20 minutos, ao abrigo da luz.
8. Após a incubação, adicione 2 mL de solução de lise com NH₄Cl 1x preparada a cada tubo e imediatamente utilize o vórtex por 5 segundos.

OBSERVAÇÃO: Para obter detalhes sobre como preparar a solução de lise, consulte a seção 7.2 acima, intitulada PREPARAÇÃO DE REAGENTES.

IMPORTANTE: Há risco de resultados errados se bolhas de ar forem pipetadas. A mistura excessiva das fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count pode criar bolhas de ar. Não misture excessivamente as fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count, e não pipete bolhas de ar para os tubos de amostra.

9. Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos, ao abrigo da luz.
10. Misture suavemente as fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count invertendo o frasco 3 a 5 vezes antes do uso.
11. Antes da aquisição e imediatamente após a etapa 9, usando uma pipeta repetidora ou de deslocamento positivo, pipete 100 µL de fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count em cada um dos três tubos.
12. Imediatamente coloque cada tubo no vórtex por 5 segundos.

OBSERVAÇÃO: Para obter detalhes sobre como preparar a solução de lise, consulte a seção 7.2 acima, intitulada **PREPARAÇÃO DE REAGENTES**.

Resumo da coloração do espécime

Reagentes/Amostras	45/34/7-AAD nº 1	Rótulo do tubo de teste 45/34/7-AAD nº 2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC/CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC/IsoClonic Control-PE			20 µL
Corante 7-AAD para verificação de viabilidade	20 µL	20 µL	20 µL
Espécime	100 µL	100 µL	100 µL
Vórtex — Incube à temperatura ambiente por 20 minutos. Proteja contra a luz.			
Solução de lise com NH ₄ Cl 1x	2 mL	2 mL	2 mL
Vórtex — Incube à temperatura ambiente por 10 minutos. Proteja contra a luz.			
Fluoroesferas Stem-Count	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex			
Para os produtos de aférese, as amostras de sangue do cordão umbilical e as amostras de medula óssea coletadas: não os deixe mais do que 60 minutos no gelo antes da aquisição.			
Para as amostras de sangue total e sangue total mobilizado, não as deixe mais do que 45 minutos no gelo antes da aquisição.			
Analise a amostra descongelada imediatamente.			
Proteja contra a luz			

Estabilidade de amostras processadas:

- Para os produtos de aférese, as amostras de sangue do cordão umbilical e as amostras de medula óssea coletados: após a adição de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, não os deixe mais do que 60 minutos no gelo antes da aquisição.
- Para as amostras de sangue total e sangue total mobilizado, após a adição de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, não as deixe mais do que 45 minutos no gelo antes da aquisição.
- Para as amostras congeladas, a aquisição deve ser efetuada imediatamente após a adição de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count.
- As amostras processadas devem ser armazenadas no gelo, protegidas da luz e, na medida do possível, devem ter exposição limitada à TA durante a aquisição.

CONTEÚDO

A azida sódica utilizada como conservante pode formar compostos explosivos em canos de escoamento metálicos. Consulte o Boletim do NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health [Instituto de segurança e saúde ocupacional dos EUA]): Explosive Azide Hazard (Perigos de explosão de azida) (16/8/76).

Para evitar o possível acúmulo de compostos de azida, enxágue os canos de escoamento com água após o descarte do reagente não diluído. O descarte da azida sódica deve ser efetuado de acordo com as normas locais apropriadas.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS COM O KIT:

1. Água deionizada.
2. Solução salina balanceada de Hank (HBSS) ou equivalente
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Fluoroesferas Flow-Check (Ref. 6605359)
5. Fluoroesferas Flow-Set (Ref. 6607007)

6. Kit de células CYTO-COMP (Ref. 6607023)
7. Kit QuickCOMP 2 (Ref. 177018)
8. Como uma alternativa às fluoroesferas Stem-Count: fluoroesferas Flow-Count (Ref. 7547053)
9. Banho de gelo
10. Tubos de teste de plástico (12 mm x 75 mm)
11. Pipeta de repetição calibrada (20 µL, 100 µL, 2 mL) e pontas ou pipetas de deslocamento positivo calibradas (20 µL, 100 µL, 2 mL) e pontas
12. Pipeta padrão calibrada (20 µL, 100 µL, 2 mL) e pontas.
13. Misturador vórtex.
14. Temporizador.
15. Citômetro de fluxo.
16. Kit do software stemCXP 2.0, stemCXP versão 2.0, WIN 7, SOMENTE para análises automatizadas de amostras no sistema do citômetro de fluxo FC 500 equipado com o software CXP (versão 2.0).

RESULTADOS

Configuração do protocolo de análise

O citômetro de fluxo deve estar equipado para detectar dispersão direta, dispersão lateral e quatro canais de fluorescência. Para o canal FL3 (para o monitoramento de fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count) use um filtro de passagem de banda de 620 nm. Para o canal FL4 (para o monitoramento do corante de viabilidade 7-AAD), use um filtro de passagem longo de 675 nm.

Certifique-se de que o citômetro de fluxo está devidamente alinhado e padronizado em termos de intensidade de fluorescência.

Certifique-se de que o citômetro de fluxo esteja ajustado corretamente para compensação de fluorescência.

OBSERVAÇÃO: Para a análise de espécimes, todas as posições da região são aproximadas até o final da aquisição do tubo 45/34/7-AAD nº 1. As regiões são otimizadas de acordo com o seguinte protocolo e NÃO são ajustadas para o segundo e terceiro tubos no painel.

Uma série de 8 histogramas e esquema de delimitação devem ser seguidas para a análise de espécimes (ver abaixo). A mesma série de 8 histogramas e esquema de delimitação deve ser seguida ao usar células de controle CD34+. As regiões A, B, C e D (veja o título “Criação de região” para a definição da região) devem ser adaptadas para incluir o agrupamento característico das células de controle CD34+.

Criação dos histogramas

Crie histogramas da seguinte forma:

1. Crie o Histograma 1 como FL1 CD45-FITC vs. dispersão lateral.
2. Crie o Histograma 2 como FL2 CD34-PE vs. dispersão lateral.
3. Crie o Histograma 3 como FL1 CD45-FITC vs. dispersão lateral.
4. Crie o Histograma 4 como dispersão frontal vs. dispersão lateral.
5. Crie o Histograma 5 como FL1 CD45-FITC vs. FL2 CD34-PE.
6. Crie o Histograma 6 como dispersão frontal vs. dispersão lateral.
7. Crie o Histograma 7 como tempo vs. fluoroesferas FL3 Stem-Count ou Flow-Count.
8. Crie o Histograma 8 como corante de viabilidade FL4 7-AAD vs. dispersão lateral.

Os Histogramas 1 a 4 destinam-se a caracterizar HPC CD34+, um processo que pode ser adiado até a etapa de análise. Estes primeiros quatro histogramas são configurados de acordo com ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (Diretrizes ISHAGE para a determinação de células CD34+ por citometria de fluxo) (1, 2). Os histogramas 5 a 7 destinam-se a monitorar parâmetros importantes durante a etapa de aquisição. Isso inclui o discriminador de dispersão direta, o número de eventos CD45+ a serem coletados e o acúmulo de singletos de fluoroesfera corretos.

O histograma 8 destina-se a discriminar e analisar eventos viáveis a partir de eventos não viáveis.

Criação de regiões

Crie regiões da seguinte forma:

1. Histograma 1 — Crie uma Região A retilínea no Histograma 1 para incluir todos os leucócitos CD45+ e eliminar plaquetas, detritos de hemácias e agregados.

2. Histograma 1 — Crie uma Região E amorfa no Histograma 1 para incluir os linfócitos (CD45 brilhante, dispersão lateral baixa).
3. Histograma 2 — Crie uma Região B retilínea no Histograma 2 para incluir todos os eventos CD34+. Defina uma contagem de 75.000 eventos (eventos CD45+) para o Histograma 2.
4. Histograma 3 — Crie uma Região C amorfa no Histograma 3 para incluir todos os eventos CD45-dim agrupados.
5. Histograma 4 — Crie uma Região D amorfa no Histograma 4 para incluir todos os eventos agrupados com dispersão lateral intermediária e dispersão frontal intermediária à alta.
6. Histograma 5 — Crie uma Região I Quadstat no Histograma 5 para verificar o limite inferior da expressão de CD45 nos eventos CD34+.
7. Histograma 5 — Crie uma Região H amorfa no Histograma 5 para cercar todas as fluoroesferas Stem-Count ou Flow-Count, incluindo duplicadas. A região H deve estar localizada no canto superior direito do Histograma 5.

OBSERVAÇÃO: Certifique-se que a Região H está desenhada como uma região AMORFA.

8. Histograma 5 — Crie a Região K retilínea (denominada “lista –”) no Histograma 5. Defina os limites da Região K na primeira década de registro do histograma de dois parâmetros. Essa Região K permite a eliminação de eventos negativos duplos durante a aquisição para analisar 75.000 eventos CD45+ relevantes.
9. Histograma 6 — Copie a Região D do Histograma 4 como a Região F no Histograma 6.
10. Histograma 7 — Crie uma Região G retilínea no Histograma 7 para incluir apenas os singletos das fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count. A Região G pode ser rotulada como “CAL” para permitir o cálculo automático dos números absolutos de HPC CD34+ (consulte o manual do instrumento para obter mais detalhes).
11. Histograma 8 — Crie uma Região J retilínea no Histograma 8 para incluir leucócitos viáveis (eventos negativos de corante de viabilidade 7-AAD).

Criação de delimitações

Crie delimitações da seguinte forma:

1. Histograma 1 — Atribua “J” ao Histograma 1 para exibir todos os eventos viáveis. Se 7-AAD não for usado, atribua a região “-H” ao Histograma 1 para exibir todos os eventos, excluindo todas as fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count, incluindo duplicadas.
2. Histograma 2 — Atribua “AJ” (“A” se 7-AAD não for utilizado) ao Histograma 2 para exibir os eventos CD34+ viáveis (total se 7-AAD não for usado).
3. Histograma 3 — Atribua “A” e “B” e “J” (“A” e “B” se 7-AAD não for utilizado) ao Histograma 3 para exibir todos os eventos CD45+/CD34+ viáveis (total se 7-AAD não for usado).
4. Histograma 4 — Atribua “A” e “B” e “C” e “J” (“A” e “B” e “C” se 7-AAD não for utilizado) ao Histograma 4 para exibir os eventos agrupados de CD45+/CD34+ viáveis (total se 7-AAD não for usado) com dispersão lateral baixa, excluindo plaquetas e detritos. Os eventos da Região ABCDJ são verdadeiramente HPC CD34+ viáveis.
5. Histograma 5 — Não delimitado, para mostrar todos os eventos.
6. Histograma 6 — Atribua “EJ” (“E” se 7-AAD não for utilizado) ao Histograma 6 para exibir os linfócitos viáveis (total se 7-AAD não for utilizado) como uma verificação visual no discriminador.
7. Histograma 7 — Atribua “H” ao Histograma 7 para exibir todas as fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count, incluindo duplicadas.
8. Histograma 8 — Atribua “A” ao Histograma 8 para exibir os eventos CD45+.

Configuração da citometria de fluxo

1. Verifique se o citômetro de fluxo está corretamente alinhado e otimizado para as intensidades de fluorescência e dispersão de luz dos detectores FL1, FL2, FL3 e FL4, de acordo com as orientações do fabricante e do laboratório. Verifique se a compensação de cor está ajustada para operação padrão. Consulte o manual do instrumento para instruções adicionais.
2. Coloque os tubos de teste no vórtex por 5 segundos.
3. Execute a aquisição de dados no citômetro de fluxo. Um mínimo de 75.000 eventos CD45+ devem ser analisados.
4. Para a análise de espécimes: ajuste o discriminador e as regiões através da análise o tubo de amostra 45/34/7-AAD nº 1. Salve o protocolo e analise os tubos 45/34/7-AAD nº 2 e 45/CTRL/7-AAD sem ajustes adicionais.

Exemplo de análise

Os histogramas apresentados no ANEXO são exibidos em uma ordem crescente de números conforme demonstrado no protocolo.

Cálculo de HPC CD34+ para o espécime

O número de HPC CD34+ é calculado como a média dos resultados estatísticos da região D para as duas amostras replicadas (ou seja, 45/34/7-AAD nº 1 e 45/34/7-AAD nº 2).

Os resultados de HPC CD34+ são considerados válidos se os resultados obtidos pelo reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE forem inferiores a 10% dos resultados de HPC CD34+.

1. Encontre a média dos resultados obtidos dos tubos 45/34/7-AAD nº 1 e 45/34/7-AAD nº 2 para cada amostra (ou seja, a média dos resultados estatísticos da Região D impressos). O número de HPC CD34+ pode estar dentro de 10% da média para as amostras duplicadas. O valor obtido com o tubo de controle 45/CTRL/7-AAD deve representar menos de 10% do valor médio obtido dos tubos de teste para validar os resultados

NOTAS:

Se a média para a contagem absoluta obtida para o evento duplicado de HPC CD34+ cair fora do intervalo aceito (ou seja, exceder 10%), determinar se a pipetagem foi realizada corretamente, especialmente para as fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count. Verifique visualmente os relatórios do citômetro de fluxo e a qualidade dos processos de coloração e lise em seus tubos de teste. Verifique a forma como os limites da região foram definidos.

Se o valor obtido com o 45/CTRL/7-AAD estiver fora do intervalo de valores aceitos (ou seja, exceder 10% da média da contagem absoluta obtida para a duplicação), determinar se a pipetagem foi executada corretamente, especialmente para as fluoroesferas Stem-Count ou fluoroesferas Flow-Count. Verifique visualmente os relatórios do citômetro de fluxo e a qualidade dos processos de coloração e lise em seus tubos de teste. Verifique a forma como os limites da região foram definidos.

Se necessário, repita a etapa de aquisição com a adição de um tubo BRANCO após o primeiro tubo duplicado 45/34/7-AAD nº 1 e nº 2 e antes do tubo 45/CTRL/7-AAD. Se necessário, repita toda a preparação com novos tubos de teste, adicionando o tubo BRANCO. Adquirir e analisar ambas as séries de tubos novos e anteriores. Compare os dois resultados. Se eles não estiverem de acordo, ligue para o representante local da Beckman Coulter.

2. Se a amostra tiver sido diluída, o resultado obtido acima DEVE ser multiplicado pelo fator de diluição (Dil) apropriado. O resultado final obtido é a contagem absoluta de HPC CD34+ (células/ μ L).

Contagem absoluta de HPC CD34+ (células/ μ L) = Resultado impresso da contagem absoluta de HPC CD34+ (células/ μ L) x Dil

3. Para a aférese, o número total de HPC CD34+ por embalagem pode ser calculado a partir da seguinte fórmula:

Número total de HPC CD34+ por embalagem = contagem absoluta de HPC CD34+ (células/ μ L) x 10^6 x volume da embalagem (L)
--

Onde:

4. Para a porcentagem de HPC CD34+ no cálculo do valor de leucócitos CD45+, consulte a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de HPC CD34+} = \frac{\text{Contagem absoluta de HPC CD34+ (células}/\mu\text{L)} \text{ (ou seja, resultados impressos da região D)}}{\text{Contagem absoluta de leucócitos CD45+ (células}/\mu\text{L)} \text{ (ou seja, resultados impressos da região A)}} \times 100$$

CONTROLE DE QUALIDADE

Certifique-se que o citômetro de fluxo está corretamente alinhado de acordo com as recomendações do fabricante listadas nos manuais do instrumento. Intensidades alvo foram estabelecidas para otimizar as configurações do instrumento de dispersão de luz e de fluorescência para a análise de amostras coradas com o reagente de anticorpo monoclonal CD45-FITC/CD34-PE e o reagente CD45-FITC/IsoClonic Control-PE.

Os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), a ficoeritrina (PE) e o corante 7-amino-actinomicina D (7-AAD) emitem em diferentes comprimentos de onda, mas apresentam uma sobreposição espectral que tem de ser corrigida por compensação eletrônica. Níveis ideais de compensação podem ser estabelecidos por análise, em um histograma de parâmetro duplo, de uma amostra de sangue total enriquecida com células de controle Stem-Trol coradas com o corante de viabilidade 7-AAD e reagentes de compensação apropriados ao usar o Software CXP. Nesta análise, ajustes são feitos para garantir que nenhuma coloração ocorra no quadrante bicolor com qualquer fluorocromo individual.

O corante de viabilidade 7-AAD (7-amino-actinomicina D) é usado para identificar células não viáveis através da análise por citometria de fluxo para permitir a enumeração das células viáveis de interesse. O corante é absorvido por células mortas (eventos brilhantes), que são excluídas das células viáveis (eventos negativos) por delimitação (veja o Histograma 8).

Antes das amostras serem analisadas, um controle testado (células de controle Stem-Trol) deve ser corado para verificar a reatividade do anticorpo.

DESEMPENHO

As características de desempenho fornecidas são baseadas em reagentes do kit Stem usados com um citômetro de fluxo COULTER EPICS XL/XL-MCL com software do sistema II. Para obter exemplos de desempenho em um FC 500 com o software CXP, consulte o Guia do sistema stemCXP.

Valores esperados para os intervalos de referência

Espécimes normais de sangue total (n = 117) foram coletados de uma população do sexo masculino (n = 58) e feminino (n = 59) para estabelecer um intervalo de referência normal. Este estudo foi realizado em um centro de avaliação externo. Os testes de repetição para cada espécime foram preparados de acordo com as instruções contidas na embalagem dos reagentes do kit Stem. Foram realizadas delimitações e análises manuais para obter os valores de CD45+, CD34+ e CD34%.

A análise estatística sugere uma distribuição não gaussiana dos dados coletados. Com base nesses achados, uma abordagem não paramétrica (robusta) foi utilizada para analisar os dados. Foram obtidos os valores de CD45+, CD34+ e CD34%. Os valores são expressos em termos de contagens absolutas (células/μL) para CD45+ e CD34+ e porcentagem da contagem total de leucócitos (CD34%), conforme exibido na tabela abaixo.

Sangue total normal: intervalos de referência

Método manual (análise robusta)	n	CD45+ (células/μL)				CD34+ (células/μL)				CD34+ (%)			
		Mín	Máx.	Média	DP (Desvio padrão)	Mín	Máx.	Média	DP (Desvio padrão)	Mín	Máx.	Média	DP (Desvio padrão)
Manual	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Esses valores são apenas representativos. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores esperados da população local de doadores normais.

Linearidade

As medições de repetição foram feitas em cada uma das 10 diluições em série para 2 tipos de amostras: sangue total periférico enriquecido com CD34+ e sangue total periférico mobilizado fresco. Um intervalo dinâmico de 0 a 2.000 células/μL e um intervalo de sensibilidade de baixo nível de 0 a 150 células/μL foram alcançadas para concentrações de HPC CD34+. As amostras foram preparadas de acordo com as informações contidas na embalagem dos reagentes do kit Stem e analisadas em um citômetro de fluxo COULTER EPICS XL/XL-MCL. Os valores são expressos como contagens absolutas (células/μL). Os resultados foram analisados em termos de análises de regressão linear para as contagens absolutas esperadas versus contagens absolutas recuperadas para a média das réplicas de células CD34+ menos endógenas. Consulte as tabelas a seguir.

As curvas das linhas de regressão fornecidas com os gráficos para as contagens absolutas totais de HPC CD34+ exibem a medição matemática da linearidade. Isso é suportado por um viés de ensaio de potencial mínimo, conforme evidenciado pelas intercepções em y para as análises. As contagens absolutas esperadas demonstram alta correlação com as contagens absolutas recuperadas.

Resultados do sangue total enriquecido com CD34+

Consulte o Anexo para o gráfico.

Resultados do sangue periférico (mobilizado)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Exatidão do método (Tabelas)
(Resultados esperados vs. resultados recuperados)

A exatidão do método é definida como o grau de concordância entre os resultados esperados e os resultados recuperados para ambos os métodos de delimitação e análise manuais e automatizadas. O sangue total periférico normal fresco foi codificado com células CD34+ purificadas para um nível de 1.875 células/μL. As contagens de células foram confirmadas por um hemacitômetro de deslizamento Malassez e diluídas em série para concentrações diferentes. Os resultados esperados são comparados aos resultados recuperados para a média das medições duplicadas usando análise e delimitação manuais e automatizadas para cada nível de diluição. Os testes para a inclinação e as ordenadas na intercepção não demonstram diferenças estatísticas entre a análise e delimitação automatizadas e os resultados esperados e nem entre a análise e delimitação manuais e os resultados esperados.

Exatidão do método — CD34+ (%)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Exatidão do método — Contagem absoluta de CD34+ (células/ μ L)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Exatidão do método — Leucócitos totais - CD45+ (células/ μ L)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Exatidão do método (Resultados automatizados vs. resultados manuais)

O grau de exatidão entre os métodos automatizado e manual do sistema stemONE foi estudado em quatro locais de avaliação externos usando sangue total periférico fresco e aférese fresca ou descongelada, sangue do cordão umbilical e espécimes de medula óssea. Os intervalos de confiança (IC) foram calculados com limites de 95%.

Espécimes de sangue total periférico fresco (n = 59 de três locais), produtos frescos de aférese (n = 51 de três locais), sangue fresco do cordão umbilical (n = 29 de dois locais), medula óssea fresca (n = 33 de dois locais), produtos de aférese descongelados (n = 23 de um local), sangue do cordão descongelado (n = 31 de dois locais) e medula óssea descongelada (n = 20 de um local) foram preparados de acordo com as instruções contidas na embalagem dos reagentes do kit Stem e analisados em citômetros de fluxo COULTER EPICS XL/XL-MCL. Foram realizadas delimitações e análises automatizadas e manuais para obter os valores de CD45+, CD34+ e CD34%.

Exatidão dos métodos (Figuras)

Amostras de sangue total periférico fresco (n = 59)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Espécimes de aférese frescos (n = 51)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Espécimes de sangue fresco do cordão umbilical (n = 29)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Espécimes de medula óssea fresca (n = 33)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Espécimes de aférese descongelados (n = 23)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Amostras de sangue de cordão descongelado (n = 31)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Espécimes de medula óssea descongelados (n = 20)

Consulte o Anexo para o gráfico.

Precisão

Precisão interlaboratorial

Os estudos foram realizados dentro de uma instalação clínica por três operadores, cada um usando um citômetro de fluxo diferente. Foram identificados três espécimes que representam o intervalo dinâmico de CD34+ (0–2.000 células/ μ L):

Baixo intervalo:	sangue periférico mobilizado e fresco
Intervalo médio:	produto de aférese
Alto intervalo:	produto de aférese

Esses espécimes foram divididos em três alíquotas, uma alíquota de cada nível (baixo, médio, alto) foi fornecida a cada um dos três operadores. As amostras foram preparadas (n = 10) a partir de cada alíquota, de acordo com as instruções contidas na embalagem dos reagentes do kit Stem. Cada operador realizou a análise em um citômetro de fluxo EPICS XL usando análise e delimitação automatizadas e manuais para obter os valores de CD45+, CD34+ e CD34%. Os valores são expressos em porcentagem (%) da contagem total de leucócitos e como contagens absolutas (células/ μ L).

Os resultados do estudo de precisão interlaboratorial, por nível, são apresentados nas tabelas a seguir. Os valores obtidos para as contagens absolutas de CD45+ e CD34+ e as porcentagens de CD34 exibiram pouca variação, conforme evidenciado pelos meios, desvios padrões e coeficientes de variação para as medições replicadas.

Consulte o Anexo para o gráfico.

Precisão intralaboratorial

Os espécimes que abrangem o intervalo dinâmico do ensaio foram obtidos usando sangue total periférico fresco, medula óssea fresca e sangue do cordão umbilical e aférese fresco e descongelado de quatro locais de avaliação externos. Dez amostras de cada um foram preparadas de acordo com as instruções contidas na embalagem dos reagentes do kit Stem e analisadas nos citômetros de fluxo COULTER EPICS XL/XL-MCL usando delimitação e análise manuais para obter os valores de CD45+, CD34+ e CD34%.

Os valores para CD45+, CD34+ e CD34% nas tabelas a seguir demonstram que o método de análise é reproduzível, conforme evidenciado pelos meios, desvios padrões e coeficientes de variação para essas medições. As tabelas de dados apresentadas no ANEXO demonstram a precisão intralaboratorial para o ensaio.

Consulte o Anexo para o gráfico.

LIMITAÇÕES

Consulte o stemCXP System Guide (Guia do sistema stemCXP) fornecido com o software do sistema stemCXP para informações sobre as limitações ao usar o método automatizado.

- As amostras coradas e lisadas devem ser armazenadas no gelo e analisadas no citômetro de fluxo de acordo com as informações na seção “Estabilidade de amostras processadas”; caso contrário, podem ocorrer resultados errôneos.
- Não dilua, retire alíquotas ou congele os reagentes. Use apenas como embalado.
- Os reagentes são apenas para uso com a citometria de fluxo.
- Descongele adequadamente os espécimes congelados para garantir uma coloração ótima.
- As hemácias podem não sofrer lise em sua totalidade nas seguintes condições: presença de hemácias nucleadas, concentração proteica anormal ou hemoglobinopatias. Isso pode causar resultados falsamente diminuídos de CD34% devido à inclusão de hemácias que não sofreram lise na contagem dos leucócitos. As contagens absolutas de CD34+ e CD45+ não devem ser afetadas.
- Certos pacientes podem apresentar problemas especiais devido a números alterados ou números muito baixos de certas populações celulares.
- Os resultados obtidos com a citometria de fluxo podem ser errôneos se as delimitações estiverem indevidamente configuradas.
- Os reagentes do kit Stem são projetados para o uso com o corante de viabilidade 7-AAD para a determinação de células HPC viáveis. Caso seu laboratório esteja usando um método de determinação de viabilidade alternativo, siga as boas práticas laboratoriais gerais e os procedimentos de controle de qualidade do seu laboratório para garantir a qualidade dos resultados relatados.

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logotipo estilizado e as marcas dos produtos e serviços da Beckman Coulter mencionados neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e em outros países.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

www.beckmancoulter.com

Legenda dos símbolos

O Glossário de símbolos está disponível em beckman.com/techdocs (documento número B60062)

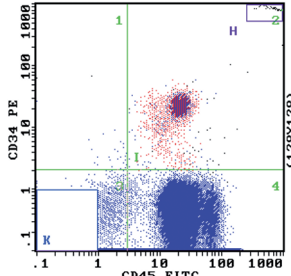
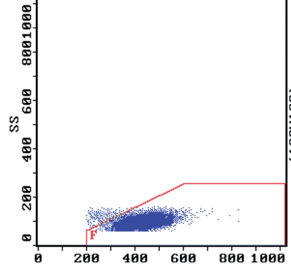
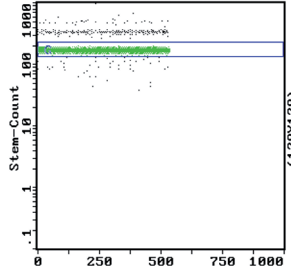
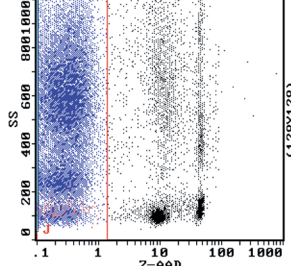
APPENDIX

- EXAMPLES

The following series of eight histograms correspond to the analysis of an apheresis sample stained with Stem-Kit Reagents.

NOTE: These Figures feature histograms obtained on a COULTER EPICS XL/ XL-MCL flow cytometer equipped with System II Software (version 3.0).

	Histogram 1 • Histogram 1 displays viable events from region J (see Histogram 8). If not using 7-AAD, Histogram 1 displays all events minus all Stem-Count Fluorospheres (i.e. « -H » see Histogram 5). NOTE : • Position Region A to include all CD45+ events (leukocytes) while excluding CD45- events. Position Region E to include only lymphocytes (bright CD45, low Side Scatter). • Region A is intended to serve as an appropriate denominator for viable WBC in the calculation of the percentage of CD34+HPC. Once the analysis is done, the absolute count of viable leukocytes is given on the statistic printout related to Region A.
	Histogram 2 • Histogram 2 displays events from region A and J. If not using 7-AAD, Histogram 2 displays events from region A. • Adjust Region B to surround CD34+ HPC, including CD34^{dim} events. The upper limit along the y-axis may be set to include CD34+ events with low to intermediate Side Scatter for CD34+ HPC.
	Histogram 3 • Histogram 3 displays events from A and B and J. If not using 7-AAD, Histogram 2 displays events from region A and B. • Adjust Region C to include cells forming a cluster with characteristic CD34+ HPC (i.e. low Side Scatter and low to intermediate CD45 staining). Note the characteristic shape of Region C. It is the cluster of events that determines where Region C is centered. Brightly FITC stained events (platelet aggregates and mature monomyeloid cells) must be excluded in the setting of this region.
	Histogram 4 • Histogram 4 displays events from A and B and C and J. If not using 7-AAD, Histogram 2 displays events from region A and B and C. • Lymph / Blast Region D identifies a cluster of events meeting all the fluorescence and light scatter criteria of ISHAGE Guidelines for CD34+ HPC. Note the characteristic shape of Region D. If present, platelet aggregates that stain weakly must be excluded to the left of Region D. • Once the analysis is complete, the absolute count of viable CD34+HPC is given on the statistic printout related to the CD34+ Stem-Trol Control Cells or CD34+ HPC (Region D).

5: 	Histogram 5 displays all events. NOTE: This histogram is useful to visualize the lower limit of CD45 expression within the CD34+ events. • Set Quadstat Region I2 to enclose all CD45+CD34+ events. Set the left boundary of Quadstat Region I2 to include all ICD34+CD45^{dim} events. Verify on Histogram 1 that the lower limit of Region A includes all CD34+ events (use Histogram 5 as a guide). • Amorphous Region H is drawn to include all Stem-Count Fluorospheres. Region H must include the last channel of the FL1 Log (on the right) and FL2 Log scales (on the top). • Set Region K (named "listgate -") to exclude most of the double negative events from the acquisition.
6: E J 	Histogram 6 • Histogram 6 displays events from E and J regions. If not using 7-AAD, Histogram 2 displays events from region E. • Verify whether the Forward and Side Scatter gain parameters of the flow cytometer are optimally set for the processed sample. If necessary, adjust the Forward Scatter voltage / gain so that the smallest lymphocytes scatter in the middle-left part of the histogram. Adjust the Forward Scatter discriminator to ensure that even the smallest lymphocytes scatter above the discriminator.
7: H 	Histogram 7 • Histogram 7 displays events from region H. • Region G encloses the Stem-Count Fluorospheres singlet population. Check that the fluorosphere singlets accumulate homogeneously and constantly over time. Region G can be labeled as CAL to allow automatic calculation of absolute numbers of CD34+ HPC. Type the correct assayed concentration of the current lot of Stem-Count Fluorospheres (refer to the next section of this insert or to the instrument manual for further details).
8: A 	Histogram 8 • Histogram 8 displays events from region A. • Viable events are included within Region J. The 7-AAD Viability Dye positive events are excluded from Region J.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Expected Values for Reference Ranges

Linearity

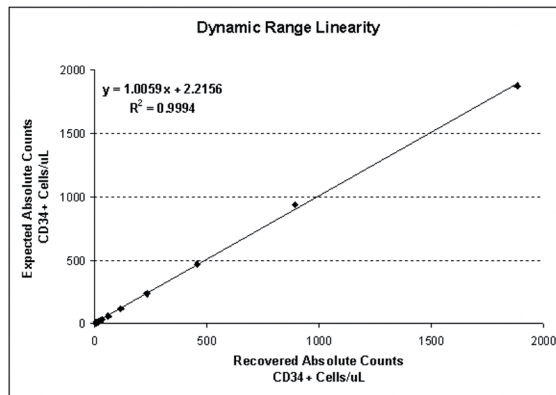
CD34+ Spiked Whole Blood Results

Linearity Results: Dynamic Range (Absolute Counts cells / μ L), Manual Gating and Analysis

Dilution	Test 1	Test 2	Control	Mean	Recovered Mean - Endogenous HPC	Expected Spiked CD34+ Cells
1	1829	1937	0	1883	1881	1875
1/2	882	905	0	893.5	892	938
1/4	461	456	0	458.5	457	469
1/8	237	235	0	236	234	234
1/16	122	115	0	118.5	117	117
1/32	58	66	0	62	60	59

Dilution	Test 1	Test 2	Control	Mean	Recovered Mean - Endogenous HPC	Expected Spiked CD34+ Cells
1/64	37	33	0	35	33	29
1/128	19	18	0	18.5	17	15
1/256	11	11	0	11	9	7
1/512	7	6	0	6.5	5	4
Endogenous	2	2	0	2		

Linearity, Dynamic Range, Manual Gating and Analysis

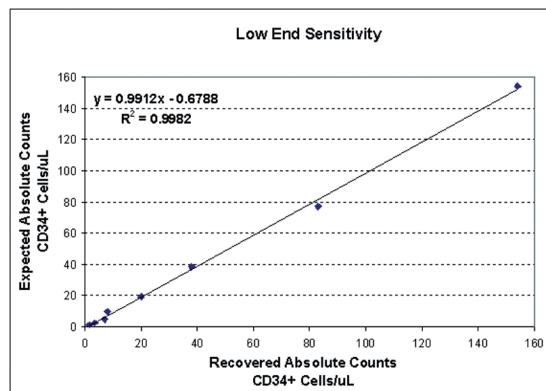


Peripheral (Mobilized) Blood Results

Linearity Results: Low End Sensitivity (Absolute Counts cells / μ L), Manual Gating and Analysis

Dilution	Test 1	Test 2	Control	Mean	Recovered Mean - Endogenous HPC	Expected HPC
1	172	140	0	156	154	154
1/2	87	83	0	85	83	77
1/4	42	38	0	40	38	39
1/8	23	21	0	22	20	19
1/16	10	10	0	10	8	10
1/32	9	9	0	9	7	5
1/64	6	5	0	5.5	4	2
1/128	3	4	0	3.5	2	1
Endogenous	2	2	0	2		

Linearity, Low End Sensitivity, Manual Gating and Analysis

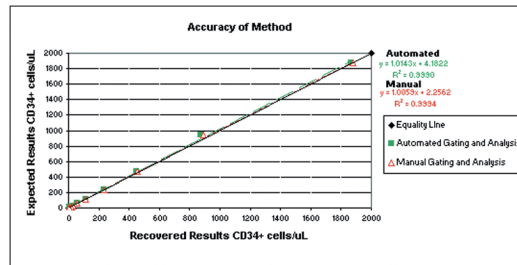


Accuracy of Method

Accuracy of Method (Expected vs. Recovered Results)

Automated Gating and Analysis		Manual Gating and Analysis	
Expected Results	Recovered Results	Expected Results	Recovered Results
1875	1868.5	1875	1881
938	871	938	891.5
469	448.5	469	456.5
234	234	234	234
117	115	117	116.5

Automated Gating and Analysis		Manual Gating and Analysis	
Expected Results	Recovered Results	Expected Results	Recovered Results
59	58	59	60
29	31.5	29	33
15	16	15	16.5
7	6.6	7	9
4	4	4	4.5



		Automated Gating and Analysis	Manual Gating and Analysis
Slope	Estimate	0.985	0.993
	p-value*	0.216	0.481
Intercept	Estimate	-3.738	-0.009
	p-value*	0.641	0.999
*T-tests for Slope = 1 and Intercept = 0			

Accuracy of Method (Automated vs. Manual Results)

Accuracy of Method - CD34+ (%)

Lab No. / Sample Type (Method)	n	CD34+ (%)						
		Min	Max	Mean	±1 SD	CV	CI	
							Lower Limit	Upper Limit
Lab 1 / Fresh Peripheral Blood (Automated)	13	0.00	9.05	0.93	2.45	263.67	-0.81	2.67
Lab 1 / Fresh Peripheral Blood (Manual)	13	0.06	9.10	1.00	2.45	245.80	-0.74	2.64
Lab 2 / Fresh Peripheral Blood (Automated)	23	0.00	0.92	0.15	0.21	137.41	0.005	0.26
Lab 2 / Fresh Peripheral Blood (Manual)	23	0.01	1.29	0.18	0.27	150.34	0.04	0.32
Lab 3 / Fresh Peripheral Blood (Automated)	23	0.03	1.04	0.34	0.29	85.02	0.20	0.49
Lab 3 / Fresh Peripheral Blood (Manual)	23	0.04	1.09	0.35	0.30	86.01	0.20	0.50
Lab 1 / Fresh Apheresis Products (Automated)	7	0.81	3.59	1.62	0.95	58.36	0.56	2.69
Lab 1 / Fresh Apheresis Products (Manual)	7	0.88	3.55	1.71	0.91	53.27	0.69	2.73
Lab 2 / Fresh Apheresis Products (Automated)	26	0.04	2.83	0.84	0.73	86.77	0.50	1.18
Lab 2 / Fresh Apheresis Products (Manual)	26	0.03	2.80	0.82	0.75	90.77	0.47	1.17
Lab 3 / Fresh Apheresis Products (Automated)	18	0.05	5.82	1.31	1.53	117.18	0.42	2.19
Lab 3 / Fresh Apheresis Products (Manual)	18	0.06	6.40	1.34	1.64	122.93	0.38	2.29
Lab 4 / Thawed Apheresis (Automated)	23	0.02	24.91	5.60	6.74	120.39	2.22	8.99
Lab 4 / Thawed Apheresis (Manual)	23	0.14	29.65	6.57	7.96	121.09	2.58	10.56
Lab 2 / Fresh Cord Blood (Automated)	8	0.10	0.76	0.43	0.19	44.55	0.24	0.62
Lab 2 / Fresh Cord Blood (Manual)	8	0.10	0.77	0.46	0.22	48.37	0.24	0.69
Lab 3 / Fresh Cord Blood (Automated)	21	0.09	1.29	0.31	0.26	84.00	0.17	0.45
Lab 3 / Fresh Cord Blood (Manual)	21	0.11	1.32	0.31	0.26	83.32	0.18	0.45
Lab 3 / Thawed Cord Blood (Automated)	21	0.05	2.56	0.89	0.65	72.91	0.55	1.24
Lab 3 / Thawed Cord Blood (Manual)	21	0.11	2.64	0.91	0.62	68.86	0.58	1.24
Lab 4 / Thawed Cord Blood (Automated)	10	0.22	0.96	0.55	0.28	51.16	0.31	0.78
Lab 4 / Thawed Cord Blood (Manual)	10	0.48	1.78	1.06	0.39	36.69	0.73	1.39
Lab 1 / Fresh Bone Marrow (Automated)	14	0.11	4.66	1.16	1.23	106.13	0.17	0.45
Lab 1 / Fresh Bone Marrow (Manual)	14	0.5	5.63	1.32	1.49	112.61	0.18	0.45
Lab 3 / Fresh Bone Marrow (Automated)	19	0.53	6.05	1.94	1.48	76.30	0.24	0.62
Lab 3 / Fresh Bone Marrow (Manual)	19	0.35	11.25	2.94	3.02	102.73	0.24	0.69
Lab 2 / Thawed Bone Marrow (Automated)	20	0.83	7.45	3.69	1.81	48.99	2.70	4.67
Lab 2 / Thawed Bone Marrow (Manual)	20	1.96	8.24	4.44	1.54	34.71	3.60	5.28

Accuracy of Method - CD34+ Absolute Count (cells / μ L)

Lab No. / Sample Type (Method)	n	CD34+ (%)						
								CI
		Min	Max	Mean	±1 SD	CV	Lower Limit	Upper Limit
Lab 1 / Fresh Peripheral Blood (Automated)	13	0	191	66.77	62.45	93.53	22.43	111.11
Lab 1 / Fresh Peripheral Blood (Manual)	13	1	208	73.88	66.31	89.75	26.80	10.97
Lab 2 / Fresh Peripheral Blood (Automated)	23	0	313	40.09	67.82	169.18	6.07	74.10
Lab 2 / Fresh Peripheral Blood (Manual)	23	0	312	39.00	67.64	173.74	5.07	72.93
Lab 3 / Fresh Peripheral Blood (Automated)	23	2	215	65.24	65.54	100.46	32.37	98.11
Lab 3 / Fresh Peripheral Blood (Manual)	23	2	223	64.41	67.57	104.90	30.52	98.30
Lab 1 / Fresh Apheresis Products (Automated)	7	202	860	463.07	254.93	55.05	177.03	749.11
Lab 1 / Fresh Apheresis Products (Manual)	7	215	856	474.50	257.18	54.20	185.93	763.07
Lab 2 / Fresh Apheresis Products (Automated)	26	9	382	131.44	105.90	80.57	81.92	180.97
Lab 2 / Fresh Apheresis Products (Manual)	26	6	394	123.35	105.79	85.77	73.87	172.82
Lab 3 / Fresh Apheresis Products (Automated)	18	17	1211	249.67	311.90	124.93	68.96	430.37
Lab 3 / Fresh Apheresis Products (Manual)	18	15	1299	250.00	329.25	131.70	59.24	440.76
Lab 4 / Thawed Apheresis (Automated)	23	4	5831	860.02	1327.55	154.36	194.15	1525.89
Lab 4 / Thawed Apheresis (Manual)	23	6	6192	808.50	1352.88	167.33	129.03	1487.07
Lab 2 / Fresh Cord Blood (Automated)	8	13	89	37.25	26.39	70.84	10.74	63.76
Lab 2 / Fresh Cord Blood (Manual)	8	9	79	33.38	25.16	75.39	8.10	58.65
Lab 3 / Fresh Cord Blood (Automated)	21	12	113	40.33	24.75	61.37	27.24	53.42
Lab 3 / Fresh Cord Blood (Manual)	21	13	113	37.64	23.89	63.45	25.01	50.27
Lab 3 / Thawed Cord Blood (Automated)	21	3	618	98.74	174.62	176.85	6.41	191.07
Lab 3 / Thawed Cord Blood (Manual)	21	4	631	102.52	175.73	171.40	9.60	195.44
Lab 4 / Thawed Cord Blood (Automated)	10	6	48	17.85	14.48	81.13	5.55	30.15
Lab 4 / Thawed Cord Blood (Manual)	10	4	49	17.70	15.31	86.51	4.70	30.70
Lab 1 / Fresh Bone Marrow (Automated)	14	1	1740	192.29	451.05	234.57	27.24	53.42
Lab 1 / Fresh Bone Marrow (Manual)	14	1	2078	216.96	540.76	249.24	25.01	50.27
Lab 3 / Fresh Bone Marrow (Automated)	19	28	1115	274.45	271.99	99.11	10.74	63.76
Lab 3 / Fresh Bone Marrow (Manual)	19	19	1188	279.24	297.32	106.48	8.10	58.65
Lab 2 / Thawed Bone Marrow (Automated)	20	33	293	145.05	80.03	55.17	101.50	188.60
Lab 2 / Thawed Bone Marrow (Manual)	20	30	278	139.03	78.15	56.21	96.50	181.55

Accuracy of Method - Total Leukocytes - CD45+ (cells / μ L)

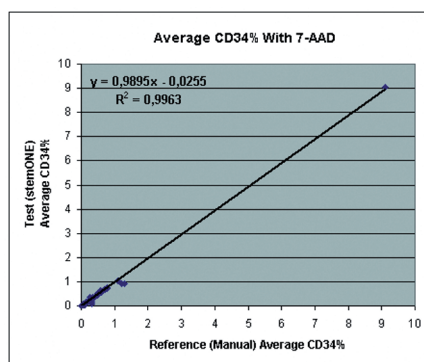
Lab No. / Sample Type (Method)	n	CD34+ (cells / μ L)						
								CI
		Min	Max	Mean	±1 SD	CV	Lower Limit	Upper Limit
Lab 1 / Fresh Peripheral Blood (Automated)	13	1835	59769	25149.12	18440.48	73.32	12055.93	38242.30
Lab 1 / Fresh Peripheral Blood (Manual)	13	1906	60968	26547.69	19947.94	75.14	12384.18	40711.21
Lab 2 / Fresh Peripheral Blood (Automated)	23	382	56177	27171.80	19640.81	72.28	17320.47	37023.14
Lab 2 / Fresh Peripheral Blood (Manual)	23	387	56382	27242.26	19722.48	72.40	17349.96	37134.56
Lab 3 / Fresh Peripheral Blood (Automated)	23	2236	32481	17605.65	7236.74	41.10	13975.89	21235.42
Lab 3 / Fresh Peripheral Blood (Manual)	23	2414	32917	17646.89	7397.23	41.92	13936.63	21357.16
Lab 1 / Fresh Apheresis Products (Automated)	7	22692	44772	28876.00	7721.27	26.74	20212.30	37539.70
Lab 1 / Fresh Apheresis Products (Manual)	7	22808	45083	29027.93	7781.27	26.81	20296.90	37758.95
Lab 2 / Fresh Apheresis Products (Automated)	26	9265	37410	17147.08	6411.77	37.39	14148.54	20145.61
Lab 2 / Fresh Apheresis Products (Manual)	26	9244	37582	17162.75	6457.88	37.63	14142.65	20182.85
Lab 3 / Fresh Apheresis Products (Automated)	18	11378	33452	20213.42	5444.91	26.94	17058.80	23368.03
Lab 3 / Fresh Apheresis Products (Manual)	18	11734	33070	20514.58	5378.22	26.22	17398.61	23630.56
Lab 4 / Thawed Apheresis (Automated)	23	3939	33245	16326.83	7960.22	48.76	12334.18	20319.47
Lab 4 / Thawed Apheresis (Manual)	23	3921	32479	15798.93	7804.07	49.40	11884.61	19713.26
Lab 2 / Fresh Cord Blood (Automated)	8	4550	17188	8958.38	4692.19	52.38	4442.92	13671.83
Lab 2 / Fresh Cord Blood (Manual)	8	4566	17200	8966.81	4709.09	52.52	4236.39	13697.24
Lab 3 / Fresh Cord Blood (Automated)	21	8764	18703	14032.79	2710.84	19.32	12599.39	15466.18
Lab 3 / Fresh Cord Blood (Manual)	21	8882	19046	14094.02	2751.92	19.53	12638.90	15549.15
Lab 3 / Thawed Cord Blood (Automated)	21	484	30866	7835.90	7082.77	90.39	4090.77	11581.04
Lab 3 / Thawed Cord Blood (Manual)	21	542	31789	8719.83	7192.23	82.48	4916.82	12522.85
Lab 4 / Thawed Cord Blood (Automated)	10	2134	4931	3113.25	1118.39	35.92	2163.65	4062.85

Lab No. / Sample Type (Method)	n	CD34+ (cells / μ L)						
								CI
		Min	Max	Mean	± 1 SD	CV	Lower Limit	Upper Limit
Lab 4 / Thawed Cord Blood (Manual)	10	1518	4322	2724.40	1061.63	38.97	1823.00	3625.80
Lab 1 / Fresh Bone Marrow (Automated)	14	938	37342	8968.36	8829.40	98.45	12599.39	15466.18
Lab 1 / Fresh Bone Marrow (Manual)	14	961	38666	9075.61	9151.80	100.84	12638.90	15549.15
Lab 3 / Fresh Bone Marrow (Automated)	19	5070	26396	13369.29	6192.49	46.32	4244.92	13671.83
Lab 3 / Fresh Bone Marrow (Manual)	19	4820	27284	10646.42	5912.00	55.53	4236.39	13697.24
Lab 2 / Thawed Bone Marrow (Automated)	20	2025	7977	3977.68	1358.94	34.16	3238.23	4717.12
Lab 2 / Thawed Bone Marrow (Manual)	20	1884	7742	3787.73	1322.52	34.92	3068.10	4507.35

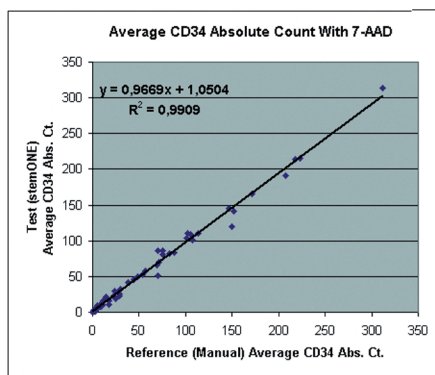
Accuracy of Method (Figures)

Fresh Peripheral Whole Blood Specimens (n = 59)

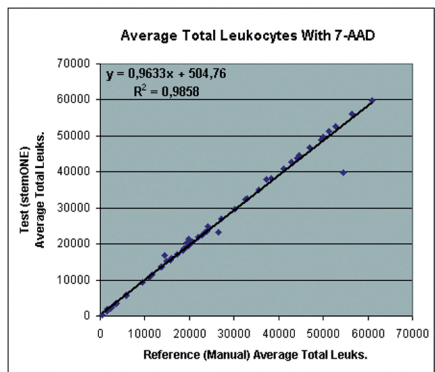
Accuracy, Fresh Peripheral Whole Blood: Average CD34%



Accuracy, Fresh Peripheral Whole Blood: Average CD34 Absolute Counts

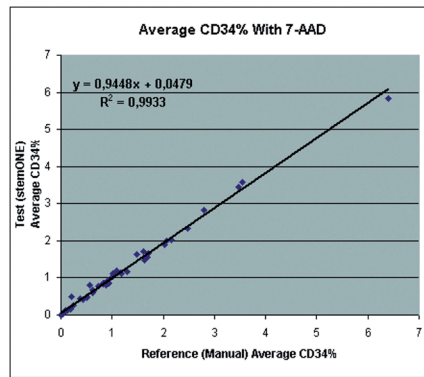


Accuracy, Fresh Peripheral Whole Blood: Average Total Leukocytes

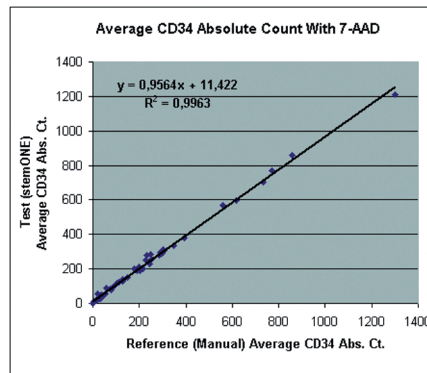


Fresh Apheresis Specimens (n = 51)

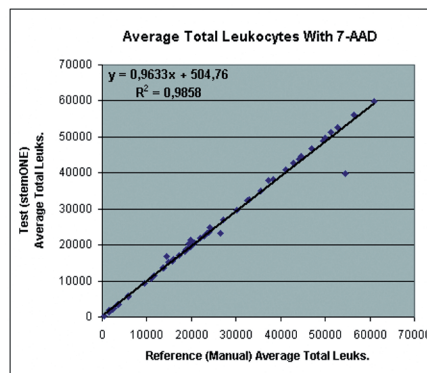
Accuracy, Fresh Apheresis Specimens: Average CD34%



Accuracy, Fresh Apheresis Specimens: Average CD34 Absolute Counts

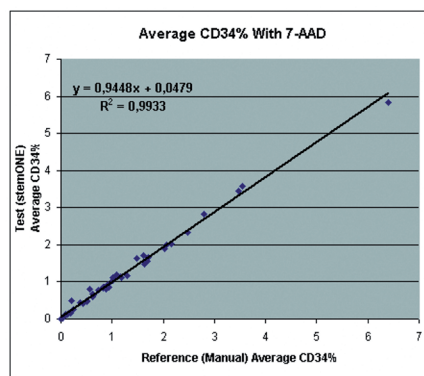


Accuracy, Fresh Apheresis Specimens: Average Total Leukocytes

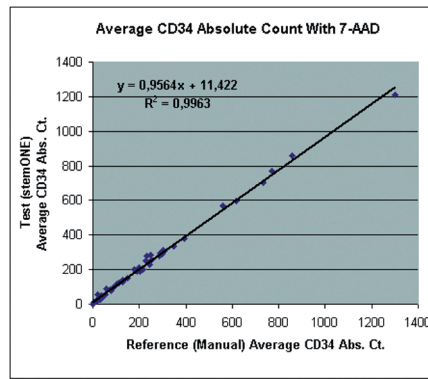


Fresh Cord Blood Specimens (n = 29)

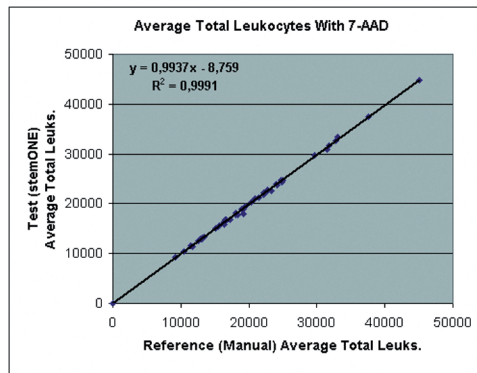
Accuracy, Fresh Cord Blood: Average CD34%



Accuracy, Fresh Cord Blood: Average CD34% Absolute Counts

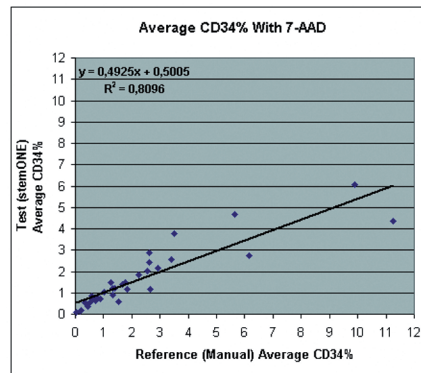


Accuracy, Fresh Cord Blood: Average Total Leukocytes

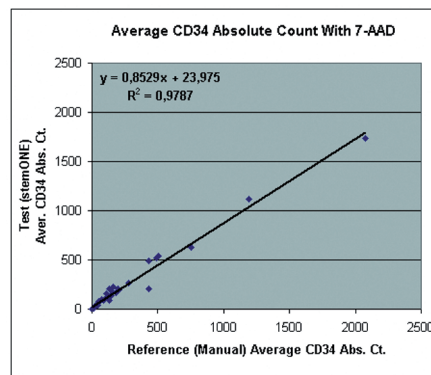


Fresh Bone Marrow Specimens (n = 33)

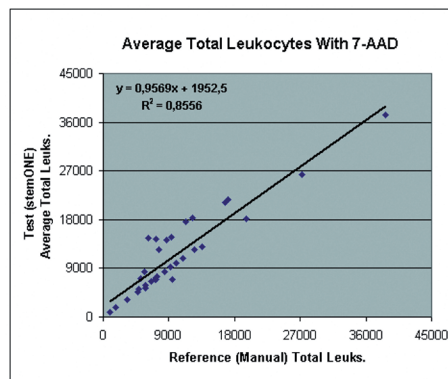
Accuracy, Fresh Bone Marrow Specimens: Average CD34%



Accuracy, Fresh Bone Marrow Specimens: Average CD34 Absolute Counts

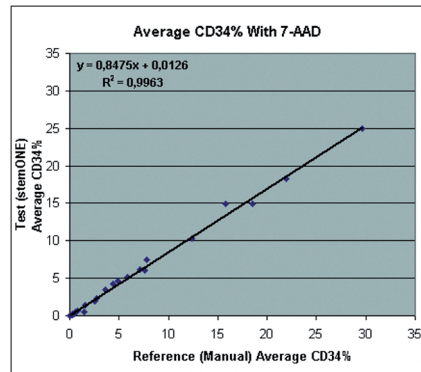


Accuracy, Fresh Bone Marrow Specimens: Average Total Leukocytes

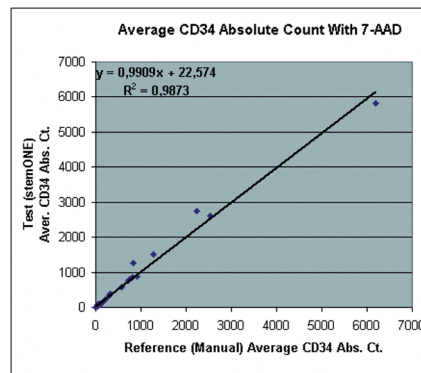


Thawed Apheresis Specimens (n = 23)

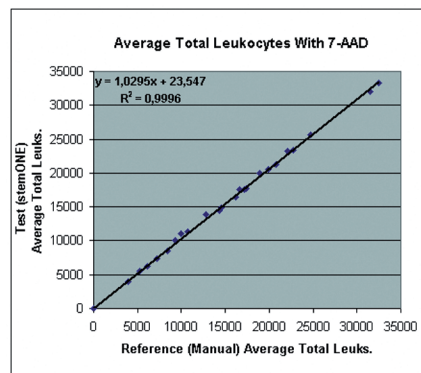
Accuracy, Thawed Apheresis Specimens: Average CD34%



Accuracy, Thawed Apheresis Specimens: Average CD34 Absolute Counts

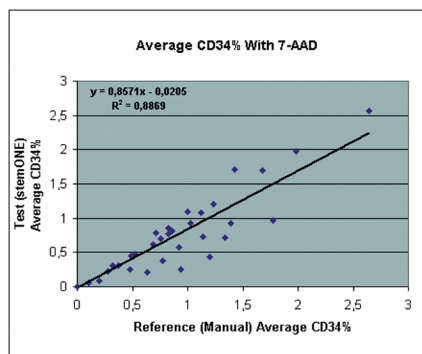


Accuracy, Thawed Apheresis Specimens: Average Total Leukocytes

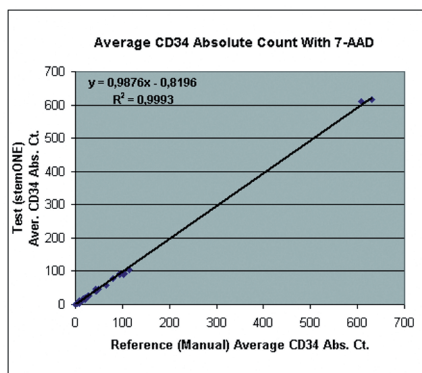


Thawed Cord Blood Specimens (n = 31)

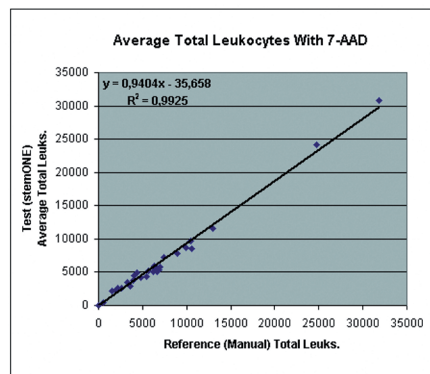
Accuracy, Thawed Cord Blood Specimens: Average CD34%



Accuracy, Thawed Cord Blood Specimens: Average CD34 Absolute Counts

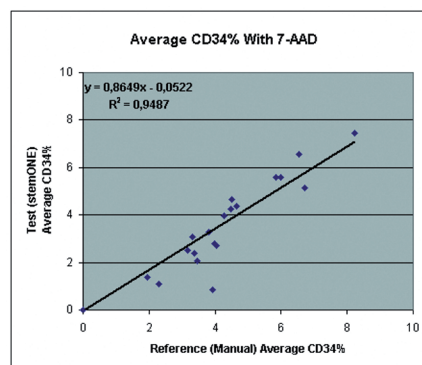


Accuracy, Thawed Cord Blood Specimens: Average Total Leukocytes

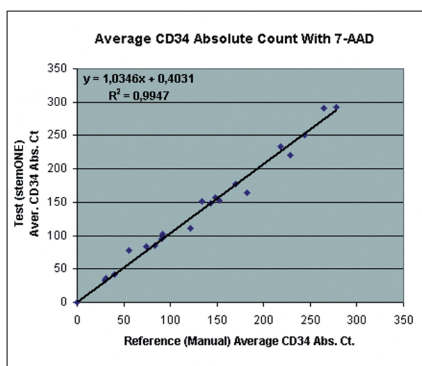


Thawed BoneSpecimens (n = 20)

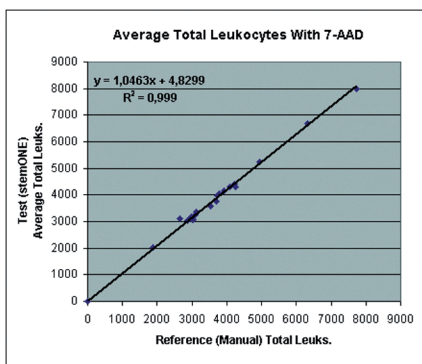
Accuracy, Thawed Apheresis Specimens: Average CD34 Absolute Counts



Accuracy, Thawed Bone Marrow Specimens: Average CD34 Absolute Counts



Accuracy, Thawed Bone Marrow Specimens: Average CD34 Total Leukocytes



Precision

Interlaboratory Precision

Interlaboratory Precision: Low Level

Instrument No. / Method	n	CD45+ (cells / μ L)			CD34+ (cells / μ L)			CD34+ (%)		
		Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV
1 / Manual	10	10637	774	7.28	12	1.25	10.70	0.12	0.01	10.90
2 / Manual	10	10318	424	4.11	11	1.29	11.80	0.11	0.01	10.51
3 / Manual	10	10187	260	2.55	11	1.43	13.49	0.11	0.01	12.90

Interlaboratory Precision: Mid-Range Level

Instrument No. / Method	n	CD45+ (cells / μ L)			CD34+ (cells / μ L)			CD34+ (%)		
		Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV
1 / Manual	10	13217	410	3.10	165	4.77	2.89	1.26	0.03	2.13
2 / Manual	10	12786	468	3.66	169	7.43	4.40	1.33	0.05	3.96
3 / Manual	10	12759	357	2.79	164	6.80	4.14	1.30	0.05	4.09

Interlaboratory Precision: High Level

Instrument No. / Method	n	CD45+ (cells / μ L)			CD34+ (cells / μ L)			CD34+ (%)		
		Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV
1 / Manual	10	443240	676	3.05	5080	12.42	4.88	1.17	0.05	4.26
2 / Manual	10	449540	647	2.88	5220	11.27	4.33	1.18	0.04	3.38
3 / Manual	10	476560	1373	5.76	5540	15.56	5.62	1.18	0.04	3.19

Interlaboratory Precision: High Level

Manual Method Lab No. / Specimen Type	n	CD45+ (cells / μ L)			CD34+ (cells / μ L)			CD34 (%)		
		Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV
Lab 1 / Fresh Peripheral Blood	10	12636	204	1.62	24	2.5	10.08	0.193	0.019	9.76
Lab 2 / Fresh Peripheral Blood	10	6080	675	11.11	5	1.0	21.60	0.074	0.015	20.20
Lab 2 / Fresh Peripheral Blood	10	19861	437	2.20	37	3.0	8.08	0.187	0.016	8.53
Lab 3 / Fresh Peripheral Blood	10	20519	500	2.44	114	4.5	3.94	0.558	0.021	3.77
Lab 3 / Fresh Peripheral Blood	10	10043	432	4.30	4	0.8	19.17	0.044	0.008	18.41
Lab 2 / Fresh Apheresis Products	10	36209	1045	2.89	361	13.8	3.82	0.997	0.035	3.55

Manual Method Lab No. / Specimen Type	n	CD45+ (cells / μ L)			CD34+ (cells / μ L)			CD34 (%)		
		Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV	Mean	± 1 SD	CV
Lab 2 / Fresh Apheresis Products	10	3723	100	2.69	19	1.5	7.69	0.516	0.035	6.74
Lab 3 / Fresh Apheresis Products	10	12081	299	2.47	239	7.3	3.06	1.978	0.037	1.88
Lab 3 / Fresh Apheresis Products	10	11537	747	6.48	5	0.9	17.90	0.046	0.008	17.95
Lab 4 / Thawed Apheresis Products	10	9730	496	5.10	2573	205.8	8.00	26.410	0.836	3.17
Lab 3 / Fresh Cord Blood	10	17378	807	4.64	71	7.5	10.56	0.408	0.036	8.90
Lab 4 / Thawed Cord Blood	10	1639	435	26.54	12	3.5	29.89	0.718	0.101	14.08
Lab 4 / Thawed Cord Blood	10	3896	733	18.80	37	6.9	18.55	0.954	0.097	10.12
Lab 3 / Fresh Bone Marrow	10	10488	507	4.83	197	13.7	6.94	1.878	0.052	2.75

REFERENCES

1. Sutherland, D.R., Anderson, L., Keeney, M., Nayar, R., Chin-Yee, I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. 1996, *J. Hematotherapy*, 5, 213-226.
2. Gratama, J.W., Keeney, M., and Sutherland, D.R. Enumeration of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Current Protocols in Cytometry*, 1999, 6.4.1-6.4.22.
3. Sutherland, D.R., Keating, A. The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. 1992, *J. Hematotherapy*, 1, 115-129.
4. Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., Stratford, M. CD34: structure, biology and clinical utility. 1996, *Blood*, 87, 1-13.
5. To, L.B., Haylock, D.N., Simmons, P.J., Juttner, C.A. The biology and clinical uses of blood stem cells. 1997, *Blood*, 89, 2233-2258.
6. Sutherland D.R., Marsh, J.C.W., Davidson, J., Baker, M.A., Keating, A., Mellors, A. Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by *Pasteurella haemolytica* glycoprotease: Implications for purification of CD34-positive progenitor cells. 1992, *Exp. Hematol.*, 20, 590-599.
7. Greaves, M.F., Titley, I., Colman, S.M., Bühring, H.-J., Campos, L., Castoldi, G.L., Garrido, F., Gaudernack, G., Girard, J.-P., Inglès-Esteve, J., Invernizzi, R., Knapp, W., Lansdorp, P.M., Lanza, F., Merle-Béral, H., Parravicini, C., Razak, K., Ruiz-Cabello, F., Springer, T.A., van der Schoot, C.E., Sutherland, D.R. CD34 cluster workshop report. 1995, *Leucocyte Typing V*, eds. Schlossman, S.F., et al., Oxford University Press, 840-846.
8. Greaves, M.F., Brown, J., Molgaard, H.V., Spurr, N.K., Robertson, D., Delia, D., Sutherland, D.R. Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. 1992, *Leukemia*, 6, 31-36.
9. Newman, W., Targan, S.R., and Fast, L.D. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. 1984, *Mol Imm*, 21, 1113-1121.
10. Fabre J.W. and Williams A.F. Quantitative serological analysis of a rabbit anti-rat lymphocyte serum and preliminary biochemical characterisation of the major antigen recognised. 1977, *Transplantation*, 23, 349-359.
11. Coffman, R. L., and Weissman, I.L. A B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. 1981, *Nature*, B220 ; 289, 681-683.
12. Dalchau, R, and Fabre, J. W. Identification with a monoclonal antibody of a predominantly B lymphocyte- specific determinant of the human leukocyte common antigen Evidence for structural and possible functional diversity of the human leukocyte common molecule. 1981, *J Exp Med*, 153, 753-765.
13. Omary, M.B., Trowbridge, I.S., and Battifora, H.A. Human homologue of murine T200 glycoprotein. 1980, *J Exp Med*, 152, 842-852.
14. Dalchau, R, Kirkley, J. and Fabre, J.W. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. 1981, *Eur J Immunol*, 10, 737-744.
15. Zelenin, A.V., Poletaev, A.I., Stepanova, N.G., Barsky, V.E., Kolesnikov, V.A., Nikitin, S.M., Zhuze, A.L., Gnatchev, N.V. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. 1984, *Cytometry*, 5, 348-354.
16. Cobbold, S., Hale, G., Waldmann, H. Non-lineage, LFA-1 family, and leukocyte common antigens: new and previously defined clusters. 1987, *Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens*, eds. McMichael, A.J., et al, Oxford University Press, 788-803.
17. Schmid, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H., Braun, J., Giorgi, J.V. Dead cell discrimination with 7-aminoactinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. 1992, *Cytometry*, 13, 204-208.
18. Gill, J.E., Jotz, M.M., Young, S.G., Modest, E.J., Sengupta, S.K. 7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties. 1975, *J. Histochem. Cytochem.*, 23, 793-799.
19. Lecoq, H., Ledru, E., Prévost, M.-C., Gougeon, M.-L. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V, and 7-AAD cytofluorometric staining methods. 1997, *J. Immunol. Methods*, 209, 111-123.
20. Civin, C.I., Trischmann, T.M., Fackler, M.J., Bernstein, I.D., Bühring, H.J., Campos, L., Greaves, M.F., Kamoun, M., Katz, D.R., Landsdorp, P.M., Look, A.T., Seed, B., Sutherland, D.R., Tindle, R.W., Uchanska-Ziegler, B. "Report on the CD34 cluster workshop" in *Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*, Knapp, W., et al., Eds., Oxford Univ. Press, p. 818-825.
21. Keeney, M., Chin-Yee, I., Weir, K., Popma, J., Nayar, R., Sutherland, D.R. Single Platform Flow Cytometric Absolute CD34+ Cell Counts Based on the ISHAGE Guidelines. 1998, *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*, 34, 61-70.

Beckman Coulter do Brasil Com. e Imp. de Prod. de Lab. Ltda
Alameda Rio Negro, 500, 15º andar, Torre B Alphaville Industrial
CEP 06.454-00 Barueri, São Paulo, Brasil
CNPJ: 42.160.812/0001-44 Telefone: 0800-771-8818

ООО «Бекмен Культер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com



IMMUNOTECH SAS A Beckman Coulter Company, 130, Avenue de Lattre de Tassigny,

BP 177, 13276 Marseille Cedex 9, France, +(33) 4 91 17 27 27

www.beckman.com