

BD OneFlow™ LST

Набор на 20 анализов — номер по
каталогу 658619

IVD

CE

BD, логотип BD, FACSCanto, FACSDiva, FACSLytic, FACSuite, Horizon, OneFlow и Vacutainer являются товарными знаками компании Becton, Dickinson and Company или ее аффилированных компаний. Все остальные товарные знаки принадлежат соответствующим владельцам. © BD, 2020. Все права защищены.



5/2020

23-15602-02



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.53.720.600
help.biosciences@bd.com

Australian and New Zealand
Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Rd
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Ltd.
14b George Bourke Drive
Mt Wellington, Auckland, 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ	5
3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ	6
4. РЕАГЕНТ	7
Состав реагента	7
Меры предосторожности	9
Хранение и обращение	10
5. ПРИБОРЫ	10
6. ОБРАЗЦЫ	11
7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ	12
Предоставляемые реагенты	12
Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы	12
8. ПРОЦЕДУРА	14
Установка анализа или шаблона	14
Настройка цитометра	16
Разведение лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution	18
Подготовка образца	18
Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLytic)	21
Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)	23
Сбор данных окрашенного образца	26

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical	29
Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva	33
9. ОГРАНИЧЕНИЯ	36
10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	37
Проточный цитометр BD FACSLytic	37
Проточный цитометр BD FACSCanto II	45
11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ	53
ГАРАНТИЯ	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	56
ИСТОРИЯ	58

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент BD OneFlow™ LST (Lymphoid Screening Tube — пробирка для лимфоидного скрининга) предназначен для проточно-цитометрического иммунофенотипирования нормальных и аномальных зрелых популяций лимфоцитов В-, Т- и NK-клеточных линий в периферической крови, костном мозге и лимфатических узлах в качестве вспомогательного средства при диагностике нарушений со стороны кроветворной системы. BD OneFlow LST предназначен для использования с соответствующим образом оснащенным проточным цитометром компании BD и программным обеспечением для диагностики *in vitro*.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

При хронических лимфопролиферативных заболеваниях (CLPD) клоногенные события ведут к экспансии и накоплению зрелых на вид лимфоцитов, которые обладают преимуществом пролиферации и (или) выживаемости над своими нормальными двойниками¹. Таким образом, обнаружение фенотипически аномальных и клональных зрелых лимфоцитов крайне важно для диагностики CLPD.

Консорциум EuroFlow™* разработал многоцветные панели антител для полного описания клеточных популяций в образце пациента при помощи иммунофенотипических маркеров, характерных для нормальных и аномальных клеток¹. В дополнение к оптимизированным многоцветным панелям антител протокол EuroFlow содержит стандартизованные процедуры настройки цитометра, определения настроек анализа, подготовки и окрашивания образца, сбора и анализа данных².

* Товарный знак и логотип EuroFlow и панели антител EuroFlow™ являются собственностью консорциума EuroFlow и не могут быть воспроизведены или опубликованы без предварительного письменного разрешения координатора EuroFlow (www.euroflow.org).

Диагностический алгоритм EuroFlow для идентификации и классификации нарушений со стороны кроветворной системы включает скрининговые панели с использованием одной пробирки и классификационные панели с использованием нескольких пробирок. Каждая пробирка содержит набор опорных маркеров и набор классификационных маркеров¹. Опорные маркеры, общие для определенного набора панелей, используются для нормализации образцов, чтобы файлы данных можно было объединять и анализировать как один большой файл данных. Это маркеры, идентифицирующие отдельные клеточные популяции в конкретной клеточной линии. Классификационные маркеры выбраны за диагностическую способность различать типы клеток в заданной клеточной линии и классифицировать аномальный тип клеток в образце.

3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ

Многopараметрическая проточная цитометрия — чувствительный и быстрый инструмент для качественного и количественного описания клеточных популяций в образце. Клетки инкубируются с конъюгированными с флуорохромом антителами, которые связываются со своими целевыми молекулами. Окрашенные клетки затем можно анализировать как одиночные. Многopараметрический анализ данных используется для идентификации клеточных популяций в образце пациента и может привести к идентификации аномальной клональной клеточной популяции.

Количество параметров, используемых при проточно-цитометрическом иммунофенотипировании нарушений со стороны кроветворной системы, в последние годы возросло. BD OneFlow LST содержит панель конъюгированных с флуорохромом антител, которые идентифицируют нормальные и аномальные популяции В-, Т- и NK-лимфоцитов. Анализ точечных графиков позволяет идентифицировать нормальные и аномальные клеточные популяции.

4. РЕАГЕНТ

Состав реагента

BD OneFlow LST состоит из одноразовых пробирок, содержащих следующие конъюгированные с флуорохромом антитела в оптимизированной высушенной форме. См. табл. 1.

Табл. 1. Панель антител BD OneFlow LST

Антитело	Флуорохром	Клон	Изотип
CD8	FITC	SK1 (Leu2a) ³	IgG ₁ , κ
Anti-Lambda	FITC	1-155-24	IgG ₁ , κ
CD56	PE	MY31 (Leu-19) ^{5,6}	IgG ₁ , κ
Anti-Kappa	PE	TB28-24	IgG ₁ , κ
CD5	PerCP-Cy TM 5.5 ^a	L17F12 ^{7,8}	IgG _{2a} , κ
CD19	PE-Cy TM 7	SJ25-C1 ^{9,10}	IgG ₁ , κ
Anti-TCRγ/δ-1	PE-Cy7	11F2 ^{11,12}	IgG ₁ , κ
CD3	APC	SK 7 ⁸	IgG ₁ , κ
CD38	APC-H7	HB7 ⁹	IgG ₁ , κ
CD4	V450 ^b	SK3 (Leu3a) ³	IgG ₁ , κ
CD20	V450	L27 ⁹	IgG ₁ , κ
CD45	V500-C ^b	2D1 ^{13,14}	IgG ₁ , κ

- a. CyTM является товарным знаком компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Карнеги — Меллон (Carnegie Mellon University), изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других способов применения. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта и вы не можете ее получить, верните этот продукт нераспакованным в компанию BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.
- b. BD HorizonTM V450, BD HorizonTM V500-C

Антитела в панели BD OneFlow LST были выбраны за свою способность разделять нормальные лимфоциты на основные субпопуляции.

CD45 идентифицирует зрелые лимфоциты и клетки-предшественники В-лимфоцитов.

CD3 идентифицирует Т-клетки. CD3 также можно использовать для идентификации В-клеток и NK-клеток методом исключения.

Anti-TCR γ / δ -1, CD5, CD4 и CD8 могут разделять Т-клетки на несколько субпопуляций.

CD19 и CD20 идентифицируют В-клетки и вместе с CD45 могут разделять В-клетки на зрелые В-лимфоциты (CD19⁺, CD20^{выс.}, CD45^{выс.}) и клетки-предшественники В-лимфоцитов (CD19⁺, CD20^{низ.}, CD45^{низ.}). CD19 и CD20 также используются для идентификации NK-клеток методом исключения.

Anti-Kappa и Anti-Lambda могут идентифицировать нормальные и клональные популяции В-клеток, экспрессирующие Ig κ или Ig λ на поверхностной мембране соответственно.

CD38 идентифицирует плазматические клетки и клетки-предшественники В-лимфоцитов. Кроме того, он полезен при оценке широкого спектра лимфоидных злокачественных образований. CD38 также может способствовать идентификации NK-клеток.

CD56 идентифицирует NK-клетки.

Полное описание возможностей антител, выбранных для BD OneFlow LST, см. в статье с описанием панелей антител EuroFlow¹.

Меры предосторожности

- Реагент содержит от 0,25 до < 1 % 5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-она и 2-метил-4-изотиазолин-3-она (3 : 1) (номер CAS 2682-20-4) и от 0,1 до < 0,25 % азида натрия (номер CAS 26628-22-8).

В Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ (ГСХ) этот реагент классифицирован как опасный. Перейдите на regdocs.bd.com для загрузки паспорта безопасности вещества.

	Предупреждение
	H317: Может вызывать аллергическую кожную реакцию. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.
Предотвращение	P261: Избегать вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / вещества в распыленном состоянии. P272: Не выносить загрязненную одежду с места работы. P280: Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз/лица. P273: Не допускать попадания в окружающую среду.
Ответные меры	P302 + P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды. P333 + P313: При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу. P321: Применение специальных мер (см. паспорт безопасности материала). P363: Постирать загрязненную одежду перед последующим использованием.
Утилизация	P501: Утилизировать содержимое/контейнер на подходящем объекте по обработке и утилизации отходов в соответствии с применимыми законами, постановлениями и характеристиками продукта на момент утилизации.

Хранение и обращение

Храните пробирки при температуре 2–27 °C в пакетах из фольги. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. При соблюдении надлежащих условий хранения высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны до истечения срока годности, указанного на пакете и этикетках пробирок. Не используйте реагент после истечения срока хранения. При соблюдении надлежащих условий хранения высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны в течение одного месяца после вскрытия пакета.

ВНИМАНИЕ! Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

5. ПРИБОРЫ

BD OneFlow LST предназначен для использования на следующих инструментах BD.

Табл. 2. Рекомендованные инструменты BD

Проточный цитометр	Настроечные гранулы	Настроечное программное обеспечение	Аналитическое программное обеспечение
BD FACSLytic™ ^{Ma}	Гранулы BD® CS&T Beads Семицветный комплект гранул BD® FC Beads 7-Color Kit Пятицветный комплект гранул BD® FC Beads 5-Color Kit	Программное обеспечение BD FACSuite™ Clinical версии 1.4 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии
BD FACSCanto™ II ^b	Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads Настроечные гранулы BD OneFlow™ Setup Beads Восьмицветный комплект гранул BD® FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow™	Программное обеспечение BD FACSDiva™ v8.0.1 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии

- a. 8-цветная конфигурация (4 синих, 2 красных, 2 фиолетовых), 10-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) или 12-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 5 фиолетовых)
- b. 3-лазерная, 8-цветная оптическая конфигурация BD 4-2H-2V по умолчанию (4-2H-2V)

6. ОБРАЗЦЫ

BD OneFlow LST можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии периферической крови и аспиратов костного мозга, собранных в пробирки с ЭДТА или гепарином^{15–18,21–23} (например, пробирки для сбора крови BD Vacutainer® blood collection tubes), а также свежих лимфатических узлов, собранных в PBS или питательной среде для выращивания культур клеток, например RPMI. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{15,16,21}.

Образцы необходимо обрабатывать сразу после сбора или в течение до 24 часов после сбора в случае хранения при комнатной температуре (20–25 °C)^{17,18,22,23}. Если обработка проводится не сразу после сбора, лаборатория должна подтвердить, что образцы, которые обрабатываются и хранятся в соответствии с процедурами данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, обработанных сразу после сбора.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендованное предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток¹⁵.

Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °C в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{19,20} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Предоставляемые реагенты

Реагент BD OneFlow LST предоставляется в виде одноразовых пробирок в пакетах из фольги. В каждом наборе содержится четыре пакета, в каждом из которых по пять пробирок BD OneFlow LST.

Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- BD OneFlow™ Assays Installer I (Инсталлятор I для анализов BD OneFlow™) (номер по каталогу 664225)

Для анализа OneFlow LST необходимо использовать инсталлятор. Анализ содержит лист сбора данных, лабораторный отчет, отчет лечащего врача и дополнительный отчет, который используется для дальнейшего обследования. Если у вас еще нет текущей версии

анализа OneFlow LST, инсталлятор необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow LST. Инсталлятор также содержит анализы для других реагентов BD OneFlow™.

Руководство по применению *BD OneFlow™ LST для проточных цитометров BD FACSLytic™* предоставляется вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Инсталлятор шаблонов для анализов BD OneFlow™ (номер по каталогу 659305)

Для шаблона OneFlow LST необходимо использовать инсталлятор. Шаблон содержит два общих рабочих листа: рабочий лист OneFlow LST Acquisition и рабочий лист OneFlow LST Analysis. Если у вас еще нет текущей версии шаблона OneFlow LST, инсталлятор необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow LST. Инсталлятор также содержит шаблон OneFlow Setup и шаблоны для других реагентов BD OneFlow.

Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™ и Руководство по применению BD OneFlow™ LST поставляются вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

- Конические полипропиленовые пробирки объемом 15 мл.
- Пастеровская пипетка.
- Серологическая пипетка.
- Микропипетка с наконечниками.
- Мешалка «вортекс».
- Центрифуга.
- Промывочный буфер (фильтрованный PBS + 0,5 % BSA + 0,09 % или 0,1 % азида натрия).

-
- Лизирующий раствор BD FACST[™] Lysing Solution (10×) (номер по каталогу 349202).

Предупреждения и меры предосторожности см. в инструкции по эксплуатации лизирующего раствора *BD FACST[™] Lysing Solution*.

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- Гранулы BD CS&T Beads (номер по каталогу 656504 или 656505).
- Семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit (№ по каталогу 656867).
- Пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit (№ по каталогу 661564).

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads (номер по каталогу 656046 или 656047).
- Настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads (номер по каталогу 658620).
- Восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow (номер по каталогу 658621).

8. ПРОЦЕДУРА

Установка анализа или шаблона

Анализ OneFlow LST, используемый с программным обеспечением BD FACSuite Clinical, или шаблон OneFlow LST, используемый с программным обеспечением BD FACSDiva, необходимо установить до первого запуска анализа. Одновременно с этим при необходимости можно установить дополнительные анализы или шаблоны. Если анализ файлов FCS осуществляется на отличной от использовавшейся для сбора данных образцов рабочей станции, анализы или шаблоны необходимо установить на обе рабочие станции.

Для установки анализа OneFlow в программном обеспечении BD FACSuite Clinical необходимо выполнить следующие действия.

-
1. Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.
Откроется мастер установки анализов BD OneFlow InstallShield.
 2. Щелкните **Next** (Далее).
Откроется лицензионное соглашение.
 3. Выберите вариант **I accept the terms in the license agreement** (Я принимаю условия лицензионного соглашения) и нажмите **Next** (Далее).
 4. Чтобы установить все анализы, имеющиеся на инсталляторе, выберите опцию **Complete** (Полная установка) и нажмите **Next** (Далее).
 5. Необязательно: Чтобы установить анализы, имеющиеся на инсталляторе, выборочно, укажите вариант **Custom** (Пользовательская установка) и нажмите **Next** (Далее).
Откроется диалоговое окно **Custom Setup** (Пользовательская настройка).
 - Нажмите на меню слева от соответствующего анализа.
 - В меню выберите **This assay will be installed on your local hard drive** (Этот анализ будет установлен на жесткий диск).
 6. Нажмите **Install** (Установить).
Анализы будут установлены в Library (Библиотека).
 7. Выберите **Finish** (Готово).
Мастер установки анализов InstallShield закроется.
 8. Необязательно: дважды щелкните ознакомительный файл (ReadMe), расположенный на инсталляторе.
Откроется ознакомительный файл (ReadMe).
 9. Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.

10. Извлеките инсталлятор.

Для установки шаблона OneFlow в программном обеспечении BD FACSDiva необходимо выполнить следующие действия.

ПРИМЕЧАНИЕ При выборе шаблона для установки он записывается поверх шаблона с таким же именем, если таковой был установлен в системе. Если вы не хотите, чтобы имеющийся на вашем компьютере шаблон был перезаписан, не выбирайте этот шаблон в установщике в процессе установки.

1. Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.
2. Следуйте инструкциям в диалоговом окне.

Инсталлятор скопирует и вставит шаблоны в папку
D:\BDExport\Templates\Panel\BD Panels.

ПРИМЕЧАНИЕ Если в вашей системе всего один жесткий диск, шаблоны будут установлены в папку
C:\BDExport\Templates\Panel\BD Panels.

По завершении установки откроется диалоговое окно с сообщением, какие шаблоны успешно скопированы в папку.

3. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть диалоговое окно.
4. Откроется ознакомительный файл инсталлятора (ReadMe). Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.
5. Извлеките инсталлятор.

Настройка цитометра

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

1. Для осуществления контроля качества определения характеристик (CQC) каждые 6 месяцев или по необходимости, ежедневного контроля качества работы (PQC), ежедневной настройки анализов и параметров пробирок используйте гранулы BD CS&T Beads

и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.

2. Для обновления эталонных настроек каждые 60 дней используйте семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.

Обратитесь к *Инструкциям по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™* и *BD FACSLytic™ Clinical Reference System* (Справочная клиническая система BD FACSLytic™), а также документации по соответствующему реагенту для получения дополнительной информации.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads (CS&T IVD Beads) и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для установки базового уровня цитометра и проведения ежедневных проверок работоспособности.
2. Используйте настроенные гранулы BD OneFlow Setup Beads, лизированную промытую кровь и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной настройки напряжений фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) и детекторов светорассеяния.
3. Используйте гранулы BD FC Beads и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной установки компенсации флуоресценции.
4. Рекомендуется убедиться, что напряжения ФЭУ (PMTV) находятся в ежедневных целевых диапазонах.

Подробную информацию см. в *Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™* и документации по соответствующему реагенту.

Разведение лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution

Разведите 10-кратный концентрат в соотношении 1:10 деионизированной водой комнатной температуры (20–25 °C). Готовый раствор стабилен в течение 1 месяца при условии хранения в контейнере из стекла или полиэтилена высокой плотности (HDPE) при комнатной температуре.

Подготовка образца

Промывка образца

ПРИМЕЧАНИЕ Перед промывкой образца убедитесь, что цитометр правильно настроен.

1. Нанесите идентификатор образца на коническую пробирку объемом 15- мл.
2. Десять раз переверните пробирку с образцом, чтобы как следует перемешать ее содержимое.
3. Добавьте в помеченную коническую пробирку 300 мкл образца.
4. Добавьте 10 мл промывочного буфера (фильтрованный PBS + 0,5 % BSA + 0,09 % или 0,1 % азида натрия).
5. Переверните пробирку 3–5 раз, чтобы как следует перемешать ее содержимое.
6. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
7. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок.
8. Перед добавлением промывочного буфера встряхните пробирку на «вортексе», чтобы не осталось клеточных агрегатов.
9. Повторите шаги 4–8 еще два раза — итого три промывки.
10. Ресуспенсируйте клеточный осадок в 200 мкл промывочного буфера до конечного объема приблизительно 300 мкл.

ПРИМЕЧАНИЕ Приступите к окрашиванию образца при помощи BD OneFlow LST в течение 30 минут после последней промывки. До окрашивания храните промытый образец при 20–25 °C.

Окрашивание образца

11. Если пакет хранился в холодильнике, не открывайте пакет, пока он не нагреется до комнатной температуры.

ПРИМЕЧАНИЕ Реагент очень чувствителен к влаге. Во избежание образования конденсата открывайте пакет, только если его температура равна комнатной.

12. Извлеките из пакета по пробирке BD OneFlow LST для каждого образца пациента.
13. Поместите пробирки в штатив, защищенный от света.

Приступите к окрашиванию образца в течение часа после изъятия пробирки из пакета.

14. Немедленно закройте пакет с неиспользованными пробирками.

ПРИМЕЧАНИЕ Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

15. Напишите идентификатор пациента в соответствующем месте на этикетке пробирки BD OneFlow LST.

ПРИМЕЧАНИЕ Вскрыв пакет, напишите на этикетке пакета текущую дату. Используйте все пробирки из пакета в течение месяца, прежде чем вскрывать новый.

16. Встряхните промытый образец на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать.
17. Добавьте в пробирку 100 мкл промытого образца. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.

Если используется меньше 100 мкл образца, добавьте промывочный буфер до конечного объема 100 мкл.

ПРИМЕЧАНИЕ Не протирайте внешнюю поверхность пробирки этиловым или изопропиловым спиртом, чтобы не смазать напечатанную этикетку.

18. Инкубируйте в течение 30 минут при 20–25 °C в темном месте.
19. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
20. Инкубируйте в течение 10 минут при 20–25 °C в темном месте.
21. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
22. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
23. Энергично встряхните на «вортексе» до полного ресуспендирования клеточного осадка.
24. Добавьте в пробирку 2 мл промывочного буфера. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
25. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
26. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
27. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы ресуспендировать клеточный осадок.
28. Добавьте в пробирку 200 мкл промывочного буфера. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.

ПРИМЕЧАНИЕ Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °C в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLytic)

Добавьте идентификатор партии реагента и срок годности в библиотеку следующим образом.

1. На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок Library (Библиотека).

Откроется рабочая область Library (Библиотека).

2. Откройте меню **Beads and Reagents** (Гранулы и реагенты) и выберите **Reagents** (Реагенты).

3. В списке **Product Name** (Наименование изделия) выберите OneFlow LST.

В нижней части страницы появится панель **OneFlow LST**.

4. Щелкните **Add Lot** (Добавить партию).

Откроется диалоговое окно **Add New Lot** (Добавить новую партию).

5. Вручную введите **Lot ID** (Идентификатор партии), указанный на этикетке пробирки.
6. Нажмите на значок календаря и выберите на календаре дату истечения срока годности, указанную на этикетке пробирки.

7. Установите флажок **Current Lot** (Текущая партия).

8. Нажмите **ОК**.

Идентификатор партии и срок годности будут добавлены в соответствующие поля сведений о реагенте.

ПРИМЕЧАНИЕ Убедитесь, что идентификатор партии реагента и срок годности добавлены в сведения о реагенте до начала сбора данных образцов. Эту процедуру необходимо выполнить только один раз для одной партии реагентов.

Порядок создания рабочей процедуры:

1. На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок **Worklists** (Рабочие процедуры).

Откроется рабочая область **Worklists** (Рабочие процедуры).

2. На вкладке **Manage Worklists** (Управление рабочими процедурами) нажмите кнопку **New** (Новая).

В новой вкладке откроется пустая рабочая процедура.

3. В разделе **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры) выберите в меню **Task** (Задача) нужную задачу.

4. Для задач, связанных с реагентами OneFlow, введите **Sample ID** (Идентификатор образца) вручную.

Не сканируйте штрихкод на этикетке пробирки в программное обеспечение.

ПРИМЕЧАНИЕ Разные партии одного и того же реагента нельзя использовать в рамках одной рабочей процедуры.

5. В разделе **Loading Options** (Параметры загрузки) выберите **Manual** (Вручную) в меню **Loading Option** (Параметры загрузки).

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)

1. В строке меню выберите **Edit > User Preferences** (Редактировать > Настройки пользователя), перейдите на вкладку **FCS** и выберите **Export FCS after recording** (Экспорт FCS после записи) для автоматического экспорта файлов FCS после сбора данных. Нажмите **ОК**.
2. Убедитесь, что выбрана конфигурация цитометра по умолчанию 4-2H-2V.
3. В строке меню выберите **Experiment > New Experiment > Blank Experiment** (Эксперимент > Новый эксперимент > Пустой эксперимент). Нажмите **ОК**.

ПРИМЕЧАНИЕ Также эксперимент можно создать непосредственно из окна **Browser** (Средство просмотра), щелкнув значок **Experiment** (Эксперимент).

4. Если отображается диалоговое окно **CST Mismatch** (Несовпадение CST), выберите **Use CST Settings** (Использовать параметры CST).
5. Переименуйте эксперимент в соответствии с правилами лаборатории.
6. В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Link Setup** (Настройки цитометра > Привязать настройки) и выберите соответствующую матрицу компенсации, рассчитанную с использованием гранул BD FC Beads в течение последних 31 суток. Щелкните **Link** (Привязать).

См. инструкцию по эксплуатации восьмицветного комплекта гранул *BD® FC Beads 8-Color Kit* для анализов *BD OneFlow™* или *Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™*.

7. Если отображается диалоговое окно **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), выберите **Overwrite** (Перезаписать).

-
8. Щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Unlink From** (Настройки цитометра > Отменить связь с [ранее связанной настройкой компенсации]). Нажмите **OK**.

ПРИМЕЧАНИЕ Отмена связи с настройкой компенсации позволяет применить обновленные параметры приложения, сохранив значения компенсации.

9. В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Application Settings > Apply** (Настройки цитометра > Параметры приложения > Применить) и выберите самые последние параметры приложения, определенные за последние 31 сутки с использованием настроечных гранул BD OneFlow Setup Beads. Щелкните **Apply** (Применить).
10. Откроется диалоговое окно **Confirm** (Подтвердить). Выберите **Keep the compensation value** (Сохранить значение компенсации).
11. При появлении диалогового окна **Confirm Cytometer Changes** (Подтвердить изменения настроек цитометра) щелкните **Yes** (Да), чтобы перезаписать значения настроек цитометра для **FSC Area Scaling** (Масштабирование области FSC).
12. В строке меню выберите **Experiment > New Specimen** (Эксперимент > Новый образец).
- Откроется диалоговое окно **Panel Templates** (Шаблоны панели).
13. Перейдите на вкладку **BD Panels** (Панели BD) и выберите шаблон OneFlow LST.
14. Укажите количество образцов пациентов, для которых необходимо выполнить сбор данных, в поле **Copies** (Копии) внизу вкладки **BD Panels** (Панели BD). Нажмите **OK**.

-
15. Переименуйте образцы, например укажите соответствующие идентификаторы пациента перед названиями образцов.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости повторить запуск конкретного образца пациента установите указатель текущей пробирки на пробирку, запуск которой нужно повторить. Нажмите кнопку **Next Tube** (Следующая пробирка) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы создать еще одну пробирку для этого пациента. Не используйте для создания дополнительной пробирки пункт меню **Experiment > New Tube** (Эксперимент > Новая пробирка) или значок **New Tube** (Новая пробирка) в строке меню **Browser** (Средство просмотра), поскольку в таком случае поля этикеток и штрихкода заполнены не будут.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости выполнить сбор данных для других образцов пациентов, окрашенных BD OneFlow LST, в данном эксперименте повторите шаги 12–15, чтобы добавить новые образцы. Откроются два диалоговых окна **Confirm** (Подтвердить) с вопросами, хотите ли вы создать еще один рабочий лист сбора данных LST или рабочий лист анализа данных LST. Нажмите **Cancel** (Отмена) в каждом диалоговом окне.

16. В строке меню выберите **Experiment > Experiment Layout** (Эксперимент > План эксперимента) и перейдите на вкладку **Keywords** (Ключевые слова).
17. Выделите ключевое слово **Product ID** (Идентификатор продукта) для соответствующей пробирки и отсканируйте штрихкод на этикетке пробирки BD OneFlow LST.

ПРИМЕЧАНИЕ Если отсканировать штрихкод на этикетке пробирки не удастся, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

18. Вручную добавьте необходимую информацию в оставшиеся ключевые слова.

-
19. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть **Experiment Layout** (План эксперимента).

Сбор данных окрашенного образца

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

Анализ автоматически соберет 100 000 событий. После начала сбора данных невозможно изменить количество событий. Поэтому, если необходимо изменить количество событий, сделайте это до начала сбора данных. Инструкции по изменению количества событий для сбора см. в *Руководстве по применению BD OneFlow™ LST для проточных цитометров BD FACSLytic™*. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

Чтобы собрать данные образца, выполните следующие действия.

1. Нажмите **Run All** (Выполнить все) в меню **Run** (Выполнить) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы выполнить рабочую процедуру с самого начала.

Либо, чтобы собрать данные для конкретной пробирки, наведите указатель выполнения на образец, для которого необходимо выполнить сбор, и нажмите **Run from Pointer** (Выполнить, начиная с положения указателя) в меню **Run** (Выполнить).

2. Встряхните каждую окрашенную пробирку на «вортексе» в течение 3–5 секунд на низкой скорости непосредственно перед сбором данных пробирки.
3. Следуйте подсказкам в программном обеспечении, чтобы загрузить или извлечь пробирки.

Откроется рабочий лист сбора данных OneFlow LST Acquisition. Рабочий лист сбора данных содержит точечные графики и гейты, позволяющие идентифицировать лейкоциты, лимфоциты, В-клетки, Т-клетки, NK-клетки и соответствующие им субпопуляции.

4. Исследуйте каждый точечный график на рабочем листе сбора данных.

ПРИМЕЧАНИЕ Время предварительного просмотра составляет 10 секунд, затем данные записываются автоматически. Не увеличивайте время предварительного просмотра и не используйте недостаточный объем образца во избежание риска его потери.

5. Если предполагается собрать менее 100 000 событий, отслеживайте объем образца и нажмите **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор данных до опустошения пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Анализ автоматически соберет 100 000 событий. Если это невозможно, сбор прекращается по истечении 5 минут. Однако необходимо отслеживать объем образцов и нажать **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор до опустошения пробирки. Инструкции по изменению критериев прекращения сбора см. в *Руководстве по применению BD OneFlow™ LST для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. В окне **Browser** (Средство просмотра) разверните соответствующий образец и установите указатель текущей пробирки на нужную.
2. Выберите вкладку рабочего листа **BD OneFlow LST Acquisition**.
3. Встряхните окрашенную пробирку в течение 3–5 секунд на низкой скорости.
4. Установите пробирку в цитометр. Установите скорость потока на **Medium** (Средняя) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных). Щелкните **Acquire Data** (Сбор данных).

-
5. Убедитесь, что популяция охвачена шкалой, и отрегулируйте гейт на первом графике рабочего листа сбора данных LST, чтобы исключить клеточные обломки, если необходимо.
 6. Щелкните **Record Data** (Регистрировать данные) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы собрать нужное количество событий.

ПРИМЕЧАНИЕ Шаблон автоматически соберет 100 000 событий. При необходимости используйте меню в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы выбрать другое количество событий для сбора. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

7. Изучите точечные графики на рабочем листе сбора данных LST и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересующие популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Для идентификации клеток используется точечный график FSC-A против SSC-A.

Точечный график CD45 V500-A против SSC-A содержит два гейта для идентификации лейкоцитов и лимфоцитов. Т-клетки и В-клетки идентифицируются на точечном графике CD3 APC-A против CD19+TCRgd PE-Cy7-A на основе популяции лимфоцитов.

T-клетки делятся на популяции TCR γ/δ^+ и TCR γ/δ^- на точечном графике популяции T-клеток CD3 APC-A против CD19+TCRgd PE-Су7-A. TCR γ/δ^- -клетки делятся на популяции CD8 $^+$ CD4 $^-$ и CD4 $^+$ CD8 $^-$ на точечном графике CD20+CD4 V450-A против CD8+IgL FITC-A.

Ig κ - и Ig λ -экспрессирующие B-клетки идентифицируются на точечном графике популяции B-клеток CD56+IgK PE-A против CD8+IgL FITC-A.

NK-клетки идентифицируются по популяции NOT(T cells OR B cells) на точечном графике CD45 V500-A против CD56+IgK PE-A.

Оставшиеся точечные графики гейтов не содержат и включены в качестве гарантии окрашивания антителами клеток образца, то есть внутреннего контроля качества окрашивания пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток на рабочем листе сбора данных LST см. в *Руководстве по применению BD OneFlow™ LST*.

8. Соберите данные следующего образца.
9. В строке меню выберите **File > Export > Experiments** (Файл > Экспортировать > Эксперименты) и выберите параметр **Directory Export** (Экспортировать каталог). Нажмите **ОК**.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical

1. Наведите указатель выполнения на соответствующий образец на панели **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры).

OneFlow LST Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow LST) откроется во вкладке **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).

-
2. Ознакомьтесь с OneFlow LST Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow LST).

На первой странице отчета представлена информация об образце и пробирке, статистика популяции и сообщения КК, при наличии.

ПРИМЕЧАНИЕ Для популяций с недостаточным числом событий строки %Parent (%Исходная) или %Grandparent (%Исходная исходной) могут отображаться со значением 0,0 %. Это происходит из-за округления результата до одного знака после запятой в программном обеспечении BD FACSuite Clinical.

3. Изучите точечные графики на 2-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

На точечных графиках OneFlow LST Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow LST) представлены гейты для анализа нормальных и аномальных клеточных популяций образца.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Точечные графики на 2-й странице отчета представляют клеточный анализ высокого уровня.

Первые три точечных графика отчета идентифицируют клетки, одиночные события FSC и одиночные события SSC. Клеточные обломки и слипшиеся клетки исключаются регулировкой гейтов.

Лейкоциты и лимфоциты идентифицируются на точечном графике CD45 V500-A против SSC-A на основе популяции одиночных событий SSC.

В-клетки (CD3-CD19⁺) и Т-клетки (CD3⁺) идентифицируются на точечном графике CD3 APC-A против CD19/TCRgd PE-Cy7-A на основе популяции лимфоцитов.

Т-клетки $\text{TCR}\gamma\delta^+$ и Т-клетки $\text{TCR}\gamma\delta^-$ идентифицируются на точечном графике CD3 APC-A против CD19/TCRgd PE-Cy7-A на основе популяции Т-клеток.

Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток см. в *Руководстве по применению BD OneFlow™ LST для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

4. Изучите точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета используются для анализа В-клеток. Изучите уровень экспрессии CD20 на точечном графике CD19/TCRgd PE-Cy7-A против CD20/CD4 V450-A.

Изучите отношение Igκ- к Igλ-экспрессирующим В-клеткам на точечном графике CD56/IgK PE-A против CD8/IgL FITC-A.

Оставшиеся точечные графики дополнительно характеризуют В-клетки при помощи различных маркеров.

5. Изучите точечные графики на 4-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 4-й странице лабораторного отчета идентифицируют различные популяции Т-клеток. $\text{TCR}\gamma\delta^-$ Т-клетки делятся на популяции $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$, $\text{CD8}^+\text{CD4}^-$, $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ и $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ на точечном графике CD20/CD4 V450-A против CD8/IgL FITC-A.

CD4^+ и CD8^+ популяции Т-клеток могут заходить в двойной положительный квадрант, вместо того чтобы выглядеть как две отдельные популяции. Это связано с панелью антител, представленной в BD OneFlow LST.

Оставшиеся точечные графики дополнительно характеризуют $\text{TCR}\gamma\delta^-$ и $\text{TCR}\gamma\delta^+$ -клетки при помощи различных маркеров.

-
6. Изучите точечные графики на 5-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 5-й странице лабораторного отчета идентифицируют NK-клетки. NK-клетки идентифицируются по популяции NOT(T cells OR B cells) на точечном графике CD45 V500-C-A против CD56/IgK PE-A.

Оставшиеся точечные графики дополнительно характеризуют NK-клетки при помощи различных маркеров.

7. Изучите 6-ю страницу лабораторного отчета.

На 6-й странице лабораторного отчета представлена информация о номере партии и сроке годности гранул BD CS&T Beads и реагента BD OneFlow, настройках контрольных значений, настройках пробирок и конфигурации цитометра.

8. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Physician Report** (Отчет для лечащего врача), чтобы просмотреть отчет.

OneFlow LST Physician Report (Отчет OneFlow LST для лечащего врача) содержит общую сводку результатов анализа.

9. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Supplemental Report** (Дополнительный отчет), чтобы включить дополнительные точечные графики для дальнейшего анализа образца.

Дополнительную информацию см. в *Руководстве по применению BD OneFlow™ LST для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые области с гейтами, удаленные в этом дополнительном отчете, отражаются в лабораторном отчете и отчете для лечащего врача. Любые области с гейтами, созданные в этом дополнительном отчете, должны быть отражены в лабораторном отчете.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Не добавляйте точечные графики и гейты в лабораторный отчет или отчет для лечащего врача. Их невозможно удалить, и они сделают отчет недействительным.

10. Перейдите на вкладку **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).
11. Щелкните **Approved** (Утверждено).

Откроется диалоговое окно **ESignature** (Электронная подпись).

12. Выберите идентификационный номер пользователя.
13. Введите пароль.
14. Дополнительно: введите комментарии.
15. Щелкните **Sign** (Подписать).

В поле E-signature (Электронная подпись) всех трех отчетов добавляются идентификационный номер пользователя, подписавшего отчеты, дата и время подписания, а также комментарии.

Дополнительные сведения и информацию о вариантах экспорта см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva

1. В строке меню выберите **File > Import > Experiments** (Файл > Импортировать > Эксперименты).
2. Выберите эксперимент, который нужно проанализировать. Щелкните **Import** (Импортировать).

Откроется эксперимент с соответствующими рабочими листами сбора и анализа данных.

3. Выберите вкладку рабочего листа **BD OneFlow LST Analysis**.
4. Изучите точечные графики на 1-й странице рабочего листа анализа данных LST и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересующие популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Первые три точечных графика на рабочем листе анализа данных LST идентифицируют клетки, одиночные события FSC и одиночные события SSC. Клеточные обломки и слипшиеся клетки исключаются регулировкой гейтов.

Изучите популяции лейкоцитов и лимфоцитов на точечном графике CD45 V500-A против SSC-A.

Изучите популяции В-клеток и Т-клеток на точечном графике популяции лимфоцитов CD3 APC-A против CD19+TCRgd PE-Cy7-A. Изучите популяции TCR γ/δ^+ и TCR γ/δ^- на точечном графике популяции Т-клеток CD3 APC-A против CD19+TCRgd PE-Cy7-A. Точечный график CD38 APC-H7-A против SSC-A приведен для сведения в целях визуализации клеток CD38 $^+$.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток см. в *Руководстве по применению BD OneFlow™ LST*.

5. Изучите точечные графики на 2-й странице рабочего листа анализа данных LST и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 2-й странице рабочего листа анализа данных идентифицируют различные популяции Т-клеток. TCR γ/δ^- Т-клетки делятся на популяции CD8 $^+$ CD4 $^-$, CD4 $^+$ CD8 $^+$, CD4 $^+$ CD8 $^-$ и CD4 $^-$

CD8⁻ на точечном графике CD20+CD4 V450-A против CD8+IgL FITC-A.

Оставшиеся точечные графики дополнительно характеризуют TCR γ/δ ⁻ и TCR γ/δ ⁺-клетки при помощи различных маркеров.

6. Изучите точечные графики на 3-й странице рабочего листа анализа данных LST и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 3-й странице рабочего листа анализа идентифицируют В-клетки. В-клетки изначально идентифицируются как CD3-CD19⁺CD45⁺. Изучите уровень экспрессии CD20 на точечном графике CD19+TCRgd PE-Cy7-A против CD20+CD4 V450-A.

Изучите отношение Igκ- к Igλ-экспрессирующим В-клеткам на точечном графике CD56+IgK PE-A против CD8+IgL FITC-A.

Оставшиеся точечные графики дополнительно характеризуют В-клетки при помощи различных маркеров.

7. Изучите точечные графики на 4-й странице рабочего листа анализа данных LST и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 4-й странице рабочего листа анализа идентифицируют NK-клетки. NK-клетки идентифицируются по популяции NOT(T cells OR B cells) на точечном графике CD45 V500-A против CD56+IgK PE-A.

Оставшиеся точечные графики дополнительно характеризуют NK-клетки при помощи различных маркеров.

8. Изучите результаты в таблице статистики на 5-й странице рабочего листа анализа данных LST.

Убедитесь, что в таблице статистики присутствуют все ключевые слова. Если какие-либо ключевые слова отсутствуют, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

9. Выполните дальнейшие анализы по мере необходимости.

ПРИМЕЧАНИЕ На точечных графиках рабочего листа анализа данных LST представлены гейты для анализа нормальных и аномальных клеточных популяций образца.

10. Сохраните рабочий лист анализа данных LST в формате PDF.

ПРИМЕЧАНИЕ Рабочий лист анализа данных — это общий рабочий лист. При изменении гейтов в ходе анализа образца в общем рабочем листе таковые будут изменены в ранее проанализированных файлах. Сохраненные файлы PDF изменены не будут, но при возвращении к ранее проанализированному общему рабочему листу придется вернуть гейты на прежнее место.

11. (Необязательно.) Щелкните **Print** (Печать), чтобы напечатать рабочий лист анализа данных LST.
12. Выполните анализ следующего образца.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Использование терапевтических моноклональных антител для лечения пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.
- Использование данного реагента при диагностической оценке нарушений со стороны кроветворной системы возможно лишь в контексте тщательного иммунофенотипического анализа, включающего другие релевантные маркеры.
- Для использования BD OneFlow LST необходимо обладать опытом иммунофенотипирования и классификации лейкоцитов и лимфом. Результаты должен интерпретировать патолог или аналогичный специалист с учетом других клинических и лабораторных данных.

-
- Эффективность реагента BD OneFlow LST при тестировании образцов пациентов с минимальной остаточной болезнью (МОБ) не установлена.
 - Не используйте образцы сомнительного качества, в том числе свернувшиеся, гемолизированные, замороженные и охлажденные образцы.
 - Испытания работы BD OneFlow LST с универсальным загрузчиком BD FACST[™] Universal Loader не проводились.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Проточный цитометр BD FACSLytic

Исследования прецизионности для воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow LST были выполнены в исследовательском центре BD Research Centre в Ирландии.

Воспроизводимость и повторяемость (проточный цитометр BD FACSLytic)

В одном центре проведено 5-дневное исследование воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow LST с использованием контрольного материала. Оценка прецизионности проводилась между тремя проточными цитометрами BD FACSLytic тремя операторами, которые собирали данные контрольных образцов BD® Multi-Check Control. Каждый оператор окрашивал два контрольных образца с использованием трех партий BD OneFlow LST. Каждый оператор выполнял по два независимых тестирования в каждый из 5 дней оценки.

Было определено процентное содержание девяти клеточных популяций, приведенных в следующих таблицах. В таблицах показано среднее значение, среднеквадратичное отклонение (SD), %CV (коэффициент вариации) и верхний 95%-й доверительный предел (CL) воспроизводимости (воспроизводимости между операторами / между

приборами и операторами / между приборами, между партиями, между тестированиями, между днями) и повторяемости (прецизионности в пределах тестирования) для каждого процентного содержания субпопуляций.

Табл. 3. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	99,78	0,13	0,15	0,14	0,15
Лимфоциты (% лейкоцитов)	36,56	0,94	1,08	2,58	2,90
Т-клетки (% лимфоцитов)	68,48	1,11	1,26	1,61	1,81
CD4 ⁺ CD8 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	66,05	0,30	0,34	0,45	0,50
CD8 ⁺ CD4 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	29,66	0,39	0,44	1,31	1,47
В-клетки (% лимфоцитов)	12,99	0,34	0,39	2,62	2,95
NK-клетки (% лимфоцитов)	17,48	1,01	1,16	5,80	6,53
IgK-клетки (% В-клеток)	62,57	1,11	1,27	1,78	2,00
IgL-клетки (% В-клеток)	33,57	1,53	1,75	4,56	5,12

Табл. 4. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	99,78	0,04	0,05	0,04	0,05
Лимфоциты (% лейкоцитов)	36,56	0,55	0,63	1,50	1,69
Т-клетки (% лимфоцитов)	68,48	0,47	0,54	0,69	0,78
CD4 ⁺ CD8 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	66,05	0,35	0,40	0,53	0,59
CD8 ⁺ CD4 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	29,66	0,35	0,40	1,18	1,32
В-клетки (% лимфоцитов)	12,99	0,24	0,28	1,88	2,11
NK-клетки (% лимфоцитов)	17,48	0,34	0,38	1,93	2,16
IgK-клетки (% В-клеток)	62,57	1,09	1,25	1,75	1,96
IgL-клетки (% В-клеток)	33,57	1,16	1,33	3,47	3,89

Сравнение методов (для проточных цитометров BD FACSLyric)

Было проведено сравнительное исследование использования системы BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLyric (исследуемый метод) и BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSCanto II (сравнительный метод) в 4 клинических центрах. Система BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLyric включает гранулы BD CS&T Beads, семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit и BD OneFlow LST со сбором данных на десятицветном проточном цитометре

BD FACSLyric (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) с использованием программного обеспечения BD FACSuite Clinical версии 1.3[†] и анализа OneFlow LST. Эталонная система BD OneFlow на BD FACSCanto II включает гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads, настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow Assay и BD OneFlow LST со сбором данных на проточном цитометре BD FACSCanto II (4-2H-2V) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva версии 8.0.2 и шаблона OneFlow LST. Всего в исследовании использовалось 98 образцов периферической крови, 26 образцов костного мозга и 16 образцов лимфатических узлов. Образцы были собраны с использованием указанных антикоагулянтов. См. табл. 5.

Табл. 5. Антикоагулянты, использованные для сбора образцов

Тип образца	Антикоагулянт	
	ЭДТА	Гепарин
Периферическая кровь	72	26
Костный мозг	23	3

Для образцов периферической крови, костного мозга и лимфатических узлов первый этап промывки начался в течение 23, 24 и 23 часов после сбора соответственно. Сбор данных окрашенных образцов периферической крови, костного мозга и лимфатических узлов выполнялся в течение 50, 48 и 31 минут после окончательного ресуспензирования соответственно. Образцы идентифицировались как «Аномальные» (аномальные по показателям В-клеток, Т-клеток или НК-клеток) или «Нормальные» (нормальные по показателям В-клеток, Т-клеток или НК-клеток) с использованием двух систем, после чего сравнивались.

[†] Проведено исследование регрессии, продемонстрировавшее эквивалентность программного обеспечения BD FACSuite Clinical версий 1.3 и 1.4.

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

Общий % согласованности = $((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100$

% положительной согласованности = $(a / (a + c)) \times 100$

% отрицательной согласованности = $(d / (d + b)) \times 100$

где

a = количество образцов, «аномальных» в обеих системах,

b = количество образцов, «аномальных» на проточном цитометре BD FACSLyric и «нормальных» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

c = количество образцов, «нормальных» на проточном цитометре BD FACSLyric и «аномальных» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

d = количество образцов, «нормальных» в обеих системах.

Результаты для всех типов клеток приведены в таблице 6.

Табл. 6. Согласованность для всех «аномальных» или «нормальных» клеток

		Сравнительный метод (проточный цитометр BD FACSCanto II)		Всего
		Аномальные	Нормальные	
Исследуемый метод (проточный цитометр BD FACSLyric)	Аномальные	63	0	63
	Нормальные	0	77	77
	Всего	63	77	140

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 97,88 %.

Положительная согласованность для «аномальных» образцов (аномальные по показателям В-клеток, Т-клеток и НК-клеток) составляет 100 %. Отрицательная согласованность для «нормальных» образцов (нормальные по показателям В-клеток, Т-клеток и НК-клеток) составляет 100 %.

Результаты для В-клеток приведены в таблице 7.

Табл. 7. Согласованность для «аномальных» или «нормальных» В-клеток

		Сравнительный метод (проточный цитометр BD FACSCanto II)		Всего
		Аномальные	Нормальные	
Исследуемый метод (проточный цитометр BD FACSLytic)	Аномальные	52	0	52
	Нормальные	0	88	88
	Всего	52	88	140

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 97,88 %.

Положительная согласованность для «аномальных» образцов (аномальные по показателям В-клеток) составляет 100 %.

Отрицательная согласованность для «нормальных» образцов (нормальные по показателям В-клеток) составляет 100 %.

Результаты для Т-клеток приведены в таблице 8.

Табл. 8. Согласованность для «аномальных» или «нормальных» Т-клеток

		Сравнительный метод (проточный цитометр BD FACSCanto II)		Всего
		Аномальные	Нормальные	
Исследуемый метод (проточный цитометр BD FACSLytic)	Аномальные	9	0	9
	Нормальные	0	131	131
	Всего	9	131	140

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 97,88 %.

Положительная согласованность для «аномальных» образцов (аномальные по показателям Т-клеток) составляет 100 %.
Отрицательная согласованность для «нормальных» образцов (нормальные по показателям Т-клеток) составляет 100 %.

Результаты для NK-клеток приведены в таблице 9.

Табл. 9. Согласованность для «аномальных» или «нормальных» NK-клеток^а

		Сравнительный метод (проточный цитометр BD FACSCanto II)		Всего
		Аномальные	Нормальные	
Исследуемый метод (проточный цитометр BD FACSLyric)	Аномальные	2	0	2
	Нормальные	0	138	138
	Всего	2	138	140

а. NK-клеточные злокачественные образования встречаются редко, поэтому ожидаемое количество образцов очень низкое.

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 97,88 %.

Положительная согласованность для «аномальных» образцов (аномальные по показателям NK-клеток) составляет 100 %.
Отрицательная согласованность для «нормальных» образцов (нормальные по показателям NK-клеток) составляет 100 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSLyric)

Количественная оценка указанных клеточных популяций, выраженная как процент от другой клеточной популяции, была выполнена для каждого оцениваемого образца, участвующего в исследовании сравнения методов. Был проведен анализ образцов с использованием системы BD OneFlow с проточным цитометром BD FACSLyric и с проточным цитометром BD FACSCanto II, как описано ранее.

Была рассчитана средняя систематическая ошибка для процентов от указанных клеточных популяций, определенных на проточном цитометре BD FACSLyric и проточном цитометре BD FACSCanto II. См. табл. 10.

Табл. 10. Обзор средней систематической ошибки для процентного содержания субпопуляций

Популяция	Количество образцов	Средняя систематическая ошибка	Нижний 95%-й CL средней систематической ошибки	Верхний 95%-й CL средней систематической ошибки
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	134	-0,27	-0,73	0,19
Лимфоциты (% лейкоцитов)	134	-0,63	-1,2	-0,06
Т-клетки (% лимфоцитов)	134	-0,17	-0,58	0,24
CD4 ⁺ CD8 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	134	-0,53	-1,03	-0,04
CD8 ⁺ CD4 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	134	0,2	-0,41	0,81
В-клетки (% лимфоцитов)	134	-0,26	-0,72	0,19
sIgκ ⁺ -клетки (% В-клеток)	134	-1,19	-2,1	-0,29
sIgλ ⁺ -клетки (% В-клеток)	134	0,7	0,02	1,38
NK-клетки (% лимфоцитов)	134	0,45	-0,07	0,98

Результаты сравнения методов и исследований эквивалентности свидетельствуют, что эти две системы по существу эквивалентны.

Проточный цитометр BD FACSCanto II

Исследования воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow LST были выполнены в лабораториях BD Biosciences в городе Сан-Хосе, штат Калифорния.

Воспроизводимость (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Два оператора выполняли по два независимых запуска в течение восьми дней на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II по очереди. Для каждого анализа каждым оператором было выполнено окрашивание двух контрольных образцов BD Multi-Check Control с использованием трех партий BD OneFlow LST с последующим сбором и анализом данных с помощью шаблона OneFlow LST в программном обеспечении BD FACSDiva. Было определено процентное содержание девяти клеточных популяций от клеточных популяций, приведенных в табл. 11. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций была рассчитана для всех клеточных популяций. Воспроизводимость включает четыре компонента: между оператором/прибором и оператором/прибором, между партиями, между анализами и между днями.

Табл. 11. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Популяция	Среднее значение	SD ^a	Верхний 95%-й CL ^b SD	%CV ^c	Верхний 95%-й CL %CV
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	100,0	0,01	0,03	0,01	0,03
Лимфоциты (% лейкоцитов)	37,9	0,5	1,1	1,2	2,9
Т-клетки (% лимфоцитов)	70,3	0,2	0,3	0,3	0,5
CD4 ⁺ CD8 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	63,4	0,5	1,5	0,8	2,4
CD8 ⁺ CD4 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	25,1	1,1	3,2	4,4	12,8
В-клетки (% лимфоцитов)	14,8	0,2	1,0	1,5	6,5

Табл. 11. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Популяция	Среднее значение	SD ^a	Верхний 95%-й CL ^b SD	%CV ^c	Верхний 95%-й CL %CV
NK-клетки (% лимфоцитов)	14,8	0,3	0,8	1,9	5,6
smIgκ ⁺ -клетки (% В-клеток)	59,4	0,2	3,1	0,3	5,2
smIgλ ⁺ -клетки (% В-клеток)	40,6	0,2	2,8	0,4	6,8

a. SD = среднеквадратичное отклонение

b. CL = доверительный предел

c. %CV = коэффициент вариации

Повторяемость (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Два оператора выполняли по два независимых запуска в течение восьми дней на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II по очереди. Для каждого анализа каждым оператором было выполнено окрашивание двух контрольных образцов BD Multi-Check Control с использованием трех партий BD OneFlow LST с последующим сбором и анализом данных с помощью шаблона OneFlow LST в программном обеспечении BD FACSDiva. Было определено процентное содержание девяти клеточных популяций от клеточных популяций, приведенных в табл. 12. Прецизионность в пределах серии измерений (повторяемость между пробирками) процентного содержания субпопуляций была рассчитана для всех клеточных популяций.

Табл. 12. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Популяция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	100,0	0,03	0,03	0,03	0,03
Лимфоциты (% лейкоцитов)	37,9	0,5	0,5	1,3	1,4

Табл. 12. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Популяция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
Т-клетки (% лимфоцитов)	70,3	0,4	0,4	0,5	0,6
CD4 ⁺ CD8 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	63,4	0,5	0,6	0,8	0,9
CD8 ⁺ CD4 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	25,1	0,7	0,8	3,0	3,2
В-клетки (% лимфоцитов)	14,8	0,3	0,3	1,8	2,0
NK-клетки (% лимфоцитов)	14,8	0,3	0,3	2,1	2,3
smIgκ ⁺ -клетки (% В-клеток)	59,4	0,8	0,8	1,3	1,4
smIgλ ⁺ -клетки (% В-клеток)	40,6	0,8	0,8	1,9	2,1

Сравнительный метод (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Было проведено сравнительное исследование работы системы BD OneFlow LST с проточным цитометром BD FACSCanto II и системы EuroFlow LST с проточным цитометром BD FACSCanto II в трех внешних клинических центрах. Система BD OneFlow LST включает настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, гранулы BD FC Beads для компенсации и реагент BD OneFlow LST. Эталонная система EuroFlow LST состоит из калибровочных частиц Sphero™ Rainbow (8 пиков), окрашенных в один цвет клеток с гранулами BD® Multicolor CompBeads для компенсации и смеси реагентов EuroFlow LST. В обоих методах используются гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads для контроля качества прибора. Аномальные популяции зрелых лимфоцитов 81 пациента с В-клеточными злокачественными образованиями, 35 пациентов с Т-клеточными злокачественными образованиями и 6 пациентов с NK-клеточными злокачественными образованиями были идентифицированы с использованием двух систем

и сопоставлены. Кроме того, 9 образцов были идентифицированы как происходящие из других линий, например образцы болезней плазматических клеток или бифенотипические образцы. Клеточные популяции 76 отрицательных образцов, включая 19 образцов здоровых доноров, были идентифицированы с использованием двух систем. Всего в исследовании использовалось 123 образца периферической крови, 53 образца костного мозга и 31 образец свежих лимфатических узлов. Образцы периферической крови и костного мозга были окрашены в течение 24 часов после сбора. Образцы лимфатических узлов были окрашены в течение 6 часов после сбора. Сбор данных всех окрашенных образцов выполнялся в течение 1 часа после окрашивания. Образцы были разделены на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны» с использованием двух систем. Было выполнено сравнение результатов.

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

$$\text{Общий \% согласованности} = ((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100$$

где

a = количество образцов, которые относятся к группе «Необходимы дополнительные анализы» согласно обеим системам;

b = количество образцов, которые согласно системе BD OneFlow относятся к группе «Необходимы дополнительные анализы», а согласно системе EuroFlow — к группе «Дополнительные анализы не нужны»;

c = количество образцов, которые согласно системе BD OneFlow относятся к группе «Дополнительные анализы не нужны», а согласно системе EuroFlow — к группе «Необходимы дополнительные анализы»;

d = количество образцов, которые относятся к группе «Дополнительные анализы не нужны» согласно обеим системам.

Результаты для всех типов клеток приведены в табл. 13.

Табл. 13. Согласованность разделения всех клеток на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны»

		Сравнительный метод (смесь Euroflow LST)		Всего
		Необходимы дополнительные анализы	Дополнительные анализы не нужны	
Исследуемый метод (BD OneFlow LST)	Необходимы дополнительные анализы	131	0	131
	Дополнительные анализы не нужны	0	76	76
	Всего	131	76	207

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 98,6 %.

Результаты для Т-клеток приведены в табл. 14.

Табл. 14. Согласованность разделения Т-клеток на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны»

		Сравнительный метод (смесь Euroflow LST)		Всего
		Необходимы дополнительные анализы	Дополнительные анализы не нужны	
Исследуемый метод (BD OneFlow LST)	Необходимы дополнительные анализы	35	0	35
	Дополнительные анализы не нужны	0	172	172
	Всего	35	172	207

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 98,6 %.

Результаты для В-клеток приведены в табл. 15.

Табл. 15. Согласованность разделения В-клеток на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны»

		Сравнительный метод (смесь Euroflow LST)		Всего
		Необходимы дополнительные анализы	Дополнительные анализы не нужны	
Исследуемый метод (BD OneFlow LST)	Необходимы дополнительные анализы	81	0	81
	Дополнительные анализы не нужны	0	126	126
	Всего	81	126	207

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 98,6 %.

Результаты для НК-клеток приведены в табл. 16.

Табл. 16. Согласованность разделения НК-клеток на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны»^a

		Сравнительный метод (смесь Euroflow LST)		Всего
		Необходимы дополнительные анализы	Дополнительные анализы не нужны	
Исследуемый метод (BD OneFlow LST)	Необходимы дополнительные анализы	6	0	6
	Дополнительные анализы не нужны	0	201	201
	Всего	6	201	207

a. НК-клеточные злокачественные образования встречаются редко, поэтому ожидаемое количество образцов очень низкое.

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 98,6 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Образцы периферической крови, костного мозга и лимфатических узлов, собранные в трех внешних клинических лабораториях, были взяты у пациентов с аномалиями Т-клеток, В-клеток или NK-клеток и у субъектов без гематологических отклонений. Анализ образцов проводился при помощи системы BD OneFlow LST и системы EuroFlow LST, описанных выше.

Сводные данные о систематической ошибке для лейкоцитов, идентифицированной как процентное содержание одиночных событий SSC, приведены в табл. 17.

Табл. 17. Сводные данные о систематической ошибке для лейкоцитов (% одиночных событий SSC)

Популяция	Количество образцов	Средняя систематическая ошибка	Нижний 95%-й CL средней систематической ошибки	Верхний 95%-й CL средней систематической ошибки
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	207	-1,1 %	-1,7 %	-0,6 %

Было определено процентное содержание оставшихся восьми клеточных популяций от клеточных популяций, приведенных в табл. 18. Статистика регрессии Деминга свидетельствует, что результаты, полученные с использованием двух систем, по существу эквивалентны.

Табл. 18. Эквивалентность системы BD OneFlow и системы EuroFlow

Популяция	Количество образцов	Свободный член	Коэффициент	Нижний 95%-й CL коэффициента	Верхний 95%-й CL коэффициента
Лимфоциты (% лейкоцитов)	207	-0,68	1,01	1,00	1,02
Т-клетки (% лимфоцитов)	207	1,07	0,99	0,98	1,00
CD4 ⁺ CD8 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	207	-0,64	1,01	1,00	1,02
CD8 ⁺ CD4 ⁻ -клетки (% Т-клеток)	207	-0,45	1,00	0,99	1,01
В-клетки (% лимфоцитов)	207	-0,01	1,00	0,99	1,00
NK-клетки (% лимфоцитов)	207	0,81	0,92	0,84	1,00
smIgk ⁺ -клетки (% В-клеток)	206 ^a	2,24	1,00	0,97	1,02
smIgl ⁺ -клетки (% В-клеток)	206 ^a	-2,04	1,00	0,98	1,03

- а. Для одного образца пациента количество событий В-клеток составило 0 и 2 для двух систем соответственно. Поскольку в данном исследовании smIgk и smIgl по определению являются процентным содержанием событий В-клеток, их невозможно определить в одной системе и потому невозможно включить в количественный анализ smIgk и smIgl для этого образца.

11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблемы, связанные с подготовкой или окрашиванием клеток

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Плохое лизирование образца	Приготовьте и окрасьте другой образец
	Плохое качество образца	Проверьте жизнеспособность клеток
	Образец слишком старый	Возьмите новый образец и немедленно его окрасьте
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток
	Промытый образец не был окрашен в течение 30 минут после последней промывки	Приготовьте свежий образец и повторите окрашивание
	Реагент BD OneFlow LST слишком долго был на свету	Повторите окрашивание с использованием новой пробирки BD OneFlow LST
	Окрашенные клетки слишком долго хранились перед сбором данных	Выполните окрашивание свежего образца и проведите сбор данных немедленно
Зарегистрировано слишком мало клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией. Повторите окрашивание и сбор данных
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора. Более подробно см. в руководстве по эксплуатации цитометра

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow LST на проточных цитометрах BD FACSLytic

Проблема	Возможная причина	Решение
Собрано недостаточно нужных клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией. Повторите окрашивание и сбор данных
	Слишком низкое значение по умолчанию — 100 000 событий для сбора	Измените количество событий для сбора. Повторите окрашивание и сбор данных. См. <i>Руководство по применению BD OneFlow™ LST для проточных цитометров BD FACSLytic™</i>
Аномальный точечный график FSC-A против SSC-A	Необходима настройка цитометра	Обратитесь в компанию BD Biosciences
Файл CSV и отчет не экспортируются автоматически	Номер партии реагента и срок годности не были вручную добавлены в библиотеку	- Добавьте номер партии реагента и срок годности в библиотеку. - Экспортируйте файл CSV и PDF-отчет вручную. См. <i>Инструкции по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™</i>

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow LST на проточных цитометрах BD FACSCanto II

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора. Подробнее см. в <i>Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™</i>
Некоторые точечные графики недоступны	Не выбраны FSC-H и SSC-H при создании параметров приложения	Убедитесь, что FSC-H и SSC-H выбраны на вкладке Parameters (Параметры) окна Inspector (Инспектор)

Проблема	Возможная причина	Решение
Не удается отсканировать штрихкод на этикетке пробирки BD OneFlow LST	Штрихкод на этикетке пробирки испорчен	Отсканируйте штрихкод на этикетке пакета с пробирками BD OneFlow LST в поле Product ID (Идентификатор продукта) в разделе Experiment Layout (План эксперимента). Затем вручную введите точку с запятой (;) и шестизначный код пробирки, который указан рядом со штрихкодом на этикетке пробирки, после последней цифры штрихкода
На рабочих листах отсутствуют точечные графики, или на точечных графиках отсутствуют гейты	Шаблон импортирован неправильно	1. Закройте текущий эксперимент. 2. Создайте новый эксперимент. 3. Повторно импортируйте шаблон OneFlow LST
Некоторые ключевые слова отсутствуют в таблице статистики на рабочем листе анализа данных	Программное обеспечение BD FACSDiva не импортировало некоторые ключевые слова в шаблон панели	1. В окне Browser (Средство просмотра) установите указатель текущей пробирки на анализируемую пробирку. 2. Перейдите на рабочий лист анализа данных. 3. Щелкните таблицу статистики правой клавишей мыши и выберите Edit Stats View (Редактировать отображение статистики). 4. На вкладке Header (Заголовок) установите флажок All (Все). 5. Нажмите OK.
Заявление For in vitro diagnostic use (Для использования в диагностике in vitro) отсутствует в нижнем колонтитуле распечатанного рабочего листа анализа данных	Изменены размеры полей листа при печати	1. В строке меню программного обеспечения BD FACSDiva выберите File > Page Setup (Файл > Параметры страницы). 2. Убедитесь, что все поля составляют 2,54 см или 1 дюйм в зависимости от стандартов по умолчанию. 3. Нажмите OK.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В СООТВЕТСТВИИ С НАСТОЯЩИМ ДОКУМЕНТОМ ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА РАСПРОСТРАНЯЮТСЯ НА ПРОДАННЫЕ ИЗДЕЛИЯ ТОЛЬКО С ЦЕЛЬЮ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И СОДЕРЖИМОГО, ЗАЯВЛЕННОГО НА ЭТИКЕТКЕ ИЛИ НА МАРКИРОВКЕ ИЗДЕЛИЯ В МОМЕНТ ДОСТАВКИ ЕГО ЗАКАЗЧИКУ. КОМПАНИЯ BD ОТКАЗЫВАЕТСЯ ОТ ВСЕХ ДРУГИХ ГАРАНТИЙ, ЯВНЫХ ИЛИ НЕЯВНЫХ, ВКЛЮЧАЯ ГАРАНТИИ ПРИГОДНОСТИ И СООТВЕТСТВИЯ ДЛЯ ЛЮБОЙ КОНКРЕТНОЙ ЦЕЛИ, А ТАКЖЕ ГАРАНТИИ НЕНАРУШЕНИЯ ПАТЕНТОВ. ИСКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ BD ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЗАМЕНОЙ ИЗДЕЛИЙ ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ПОКУПНОЙ ЦЕНЫ. КОМПАНИЯ BD НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА МАТЕРИАЛЬНЫЙ УЩЕРБ ИЛИ ЛЮБЫЕ СЛУЧАЙНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ, ВКЛЮЧАЯ ТРАВМЫ ИЛИ ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОТЕРИ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗДЕЛИЕМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26:1908-1975.
- 2 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26:1986-2010.
- 3 Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:9-108.
- 4 Kubagawa H, Gathings WE, Levitt D, Kearney JF, Cooper MD. Immunoglobulin isotype expression of normal pre-B cells as determined by immunofluorescence. *J Clin Immunol*. 1982;2:264-269.
- 5 Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
- 6 Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. NK-cell antigens: section report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. Vol 2. New York, NY: Oxford University Press; 1995:1367-1372.
- 7 Engleman EG, Warnke R, Fox RI, Dille J, Benike CJ, Levy R. Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:1791-1795.

-
- 8 Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
 - 9 Ling NR, MacLennan ICM, Mason DY. B-cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leukocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:302-335.
 - 10 Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and Comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-43.
 - 11 Borst J, van Dongen J, Bolhuis R, et al. Distinct molecular forms of human T cell receptor $\gamma\delta$ detected on viable T cells by a monoclonal antibody. *J Exp Med*. 1988;167:1625-1644.
 - 12 Ichinohasama R, Miura I, Takahashi T, et al. Peripheral CD4+ CD8- $\gamma\delta$ T cell lymphoma: a case report with multiparameter analyses. *Hum Pathol*. 1996;27:1370-1377.
 - 13 Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leukocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
 - 14 Appendix C. Summary of antibody names, code numbers, and donor laboratories. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leukocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:988-993.
 - 15 Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
 - 16 Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy PJ, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
 - 17 Nicholson JKA, Green TA. Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping: effect of specimen age on results. *J Immunol Methods*. 1993;165:31-35.
 - 18 Paxton H, Bendele T. Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann NY Acad Sci*. 1993;677:440-443.
 - 19 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
 - 20 Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
 - 21 Davis BH, Dasgupta A, Kussick S, Han JY, Estrellado A; on behalf of ICSH/ICCS working group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part II - preanalytical issues. *Cytometry Part B* 2013;84B:286-290.

- 22 Stetler-Stevenson M, Greig B, Yuan C. Flow cytometric specimen collection, processing, and reporting. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, eds. *Laboratory Hematology Practice*. First Edition. Hoboken, NJ; Wiley-Blackwell Inc.; 2012:105-114.
- 23 Stetler-Stevenson M, Ahmad E, Barnett D, et al. *Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H43-A2.

ИСТОРИЯ

Редакция	Дата	Внесенные изменения
23-15602-00	7/2014	Первый выпуск
23-15602-01	12/2016	Переработано для нового шаблона OneFlow LST
23-15602-02	5/2020	Переработано для поддержки использования продукта на проточных цитометрах BD FACSLytic

BD OneFlow™ PCST

Набор на 10 анализов —
номер по каталогу 659912

IVD



BD, логотип BD, FACSCanto, FACSDiva, FACSLytic, FACSuite, Horizon, OneFlow и Vacutainer являются товарными знаками компании Becton, Dickinson and Company или ее аффилированных компаний. Все остальные товарные знаки принадлежат соответствующим владельцам. © BD, 2020. Все права защищены.



5/2020

23-16839-01



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA

Australian and New Zealand
Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Rd
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Ltd.
14b George Bourke Drive
Mt Wellington, Auckland, 1060
New Zealand



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.53.720.600
help.biosciences@bd.com

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ	5
3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ	6
4. РЕАГЕНТ	7
Состав реагента	7
Меры предосторожности	8
Хранение и обращение	9
5. ПРИБОРЫ	10
6. ОБРАЗЦЫ	11
7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ	12
Предоставляемые реагенты	12
Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы	12
8. ПРОЦЕДУРА	14
Установка анализа или шаблона OneFlow PCST	14
Настройка цитометра	16
Подготовка образца	18
Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLytic)	22
Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)	24
Сбор данных окрашенного образца	27
Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical	31

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva.....	33
9. ОГРАНИЧЕНИЯ.....	36
10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	37
Проточный цитометр BD FACSLytic	37
Проточный цитометр BD FACSCanto II.....	42
11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ	50
ГАРАНТИЯ.....	54
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	54
ИСТОРИЯ	56

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Пробирки BD OneFlow™ PCST (Plasma Cell Screening Tube — пробирка для скрининга плазматических клеток) предназначены для проточно-цитометрического иммунофенотипирования нормальных поликлональных и аномальных популяций плазматических клеток в костном мозге в качестве вспомогательного средства при диагностике нарушений со стороны кроветворной системы. Пробирка BD OneFlow PCST предназначена для использования с соответствующим образом оснащённым проточным цитометром компании BD и программным обеспечением для диагностики *in vitro*.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Болезни плазматических клеток — это группа заболеваний, которые, как правило, характеризуются наличием клональной (опухолевой) популяции плазматических клеток в костном мозге¹. Эти клетки могут секретировать клональный иммуноглобулин, обнаруживаемый в крови. К данной группе заболеваний относятся, в частности, такие болезни как множественная миелома и моноклональная гаммапатия неясного генеза.

Консорциум EuroFlow™* разработал многоцветные панели антител для полного описания клеточных популяций в образце пациента при помощи иммунофенотипических маркеров, характерных для нормальных и аномальных клеток¹. В дополнение к оптимизированным многоцветным панелям антител протокол EuroFlow содержит стандартизованные процедуры настройки цитометра, определения настроек анализа, подготовки и окрашивания образца, сбора и анализа данных².

* Товарный знак и логотип EuroFlow и панели антител EuroFlow™ являются собственностью консорциума EuroFlow и не могут быть воспроизведены или опубликованы без предварительного письменного разрешения координатора EuroFlow (www.euroflow.org).

Диагностический алгоритм EuroFlow для идентификации и классификации нарушений со стороны кроветворной системы включает скрининговые панели с использованием одной пробирки и классификационные панели с использованием нескольких пробирок. Каждая пробирка содержит набор опорных маркеров и набор классификационных маркеров¹. Опорные маркеры, общие для определенного набора панелей, используются для нормализации образцов, чтобы файлы данных можно было объединять и анализировать как один большой файл данных. Это маркеры, идентифицирующие отдельные клеточные популяции в конкретной клеточной линии. Классификационные маркеры выбраны за диагностическую способность различать типы клеток в заданной клеточной линии и классифицировать аномальный тип клеток в образце.

3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ

Многopараметрическая проточная цитометрия — чувствительный и быстрый инструмент для качественного и количественного описания клеточных популяций в образце. Клетки инкубируются с конъюгированными с флуорохромом антителами, которые связываются со своими целевыми молекулами. Окрашенные клетки затем можно анализировать как одиночные. Многopараметрический анализ данных используется для идентификации клеточных популяций в образце пациента и может привести к идентификации аномальной клональной клеточной популяции.

Количество параметров, используемых при проточно-цитометрическом иммунофенотипировании нарушений со стороны кроветворной системы, в последние годы возросло. BD OneFlow PCST содержит панель конъюгированных с флуорохромом антител, которые идентифицируют нормальные и аномальные популяции плазматических клеток. Анализ точечных графиков позволяет идентифицировать нормальные и аномальные клеточные популяции.

4. РЕАГЕНТ

Состав реагента

BD OneFlow PCST состоит из двух одноразовых пробирок, содержащих конъюгированные с флуорохромом антитела в оптимизированной высушенной форме. Пробирка BD OneFlow PCST (S) содержит антитела, которые распознают маркеры на поверхности клеток, а пробирка BD OneFlow PCST (C) — антитела, которые распознают Igκ и Igλ в цитоплазме клеток после их фиксации и пермеабиллизации. См. табл. 1

Табл. 1. Панель антител BD OneFlow PCST

Антитело	Пробирка	Флуорохром	Клон	Изотип
CD38	S	FITC	HB7 ³	IgG ₁ , κ
CD56	S	PE	MY31 (Leu-19) ^{4,5}	IgG ₁ , κ
β2-микроглобулин	S	PerCP-Cy TM 5.5 ^a	TÜ99 ⁶	IgM, κ
CD19	S	PE-Cy TM 7 ^a	SJ25-C1 ^{3,7}	IgG ₁ , κ
Anti-Kappa	C	APC	TB28-2 ⁸	IgG ₁ , κ
Anti-Lambda	C	APC-H7	1-155-2 ⁸	IgG ₁ , κ
CD45	S	V450 ^b	2D1 (анти-HLe-1) ^{9,10}	IgG ₁ , κ
CD138	S	V500-C ^b	MI15 ^{11,12}	IgG ₁ , κ

- a. CyTM является товарным знаком компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Карнеги — Меллон (Carnegie Mellon University), изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других способов применения. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта и вы не можете ее получить, верните этот продукт нераспакованным в компанию BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.
- b. BD HorizonTM V450, BD HorizonTM V500-C

Антитела в пробирке BD OneFlow PCST были выбраны за свою способность идентифицировать и характеризовать плазматические клетки.

CD38, CD138, CD45 и CD19 — опорные маркеры для идентификации плазматических клеток.

CD56 и $\beta 2$ -микроглобулин — классификационные маркеры для идентификации аномальных популяций плазматических клеток.

Anti-Kappa и Anti-Lambda используются для оценки клональности плазматических клеток.

CD19, Anti-Kappa и Anti-Lambda также используются, чтобы идентифицировать и характеризовать зрелые В-лимфоциты.

Полное описание возможностей антител, выбранных для пробирки BD OneFlow PCST, см. в статье с описанием панелей антител EuroFlow¹.

Меры предосторожности

- Реагенты содержат от 0,25 до < 1 % 5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-она и 2-метил-4-изотиазолин-3-она (3 : 1) (номер CAS 2682-20-4) и от 0,1 до < 0,25 % азида натрия (номер CAS 26628-22-8). В Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ (СГС) эти реагенты классифицированы как опасные. Перейдите на regdocs.bd.com для загрузки паспорта безопасности вещества.

	Предупреждение
	H317: Может вызывать аллергическую кожную реакцию. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.
Предотвращение	P261: Избегать вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / вещества в распыленном состоянии. P272: Не выносить загрязненную одежду с места работы. P280: Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз/лица. P273: Не допускать попадания в окружающую среду.
Ответные меры	P302 + P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды. P333 + P313: При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу. P321: Применение специальных мер (см. паспорт безопасности материала). P363: Постирать загрязненную одежду перед последующим использованием.
Утилизация	P501: Утилизировать содержимое/контейнер на подходящем объекте по обработке и утилизации отходов в соответствии с применимыми законами, постановлениями и характеристиками продукта на момент утилизации.

Хранение и обращение

Храните пробирки при температуре 2–27 °C в пакетах из фольги.

Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками.

При соблюдении надлежащих условий хранения высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны до истечения срока годности, указанного на пакете и этикетках пробирок.

Не используйте реагент после истечения срока хранения.

При соблюдении надлежащих условий хранения высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны в течение одного месяца после вскрытия пакета.

ВНИМАНИЕ! Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

5. ПРИБОРЫ

BD OneFlow PCST предназначен для использования на следующих инструментах BD.

Табл. 2. Рекомендованные инструменты BD

Проточный цитометр	Настроечные гранулы	Настроечное программное обеспечение	Аналитическое программное обеспечение
BD FACSLytic™ ^а	Гранулы BD® CS&T Beads Семичетный комплект гранул BD® FC Beads 7-Color Kit Пятицветный комплект гранул BD® FC Beads 5-Color Kit	Программное обеспечение BD FACSuite™ Clinical версии 1.4 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии
BD FACSCanto™ Цб	Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads Настроечные гранулы BD OneFlow™ Setup Beads Восьмицветный комплект гранул BD® FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow™	Программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии

- а. 8-цветная конфигурация (4 синих, 2 красных, 2 фиолетовых), 10-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) или 12-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 5 фиолетовых)
 б. 3-лазерная, 8-цветная оптическая конфигурация BD 4-2H-2V по умолчанию (4-2H-2V)

6. ОБРАЗЦЫ

Пробирку BD OneFlow PCST можно использовать для проточно-цитометрического иммунофенотипирования аспиратов костного мозга, собранных в пробирки с ЭДТА или гепарином¹³⁻¹⁹ (например, в пробирки для сбора крови BD Vacutainer® blood collection tubes). Храните образцы перед окрашиванием при температуре 15–27 °С. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{13,14,17}.

Образцы необходимо обрабатывать сразу после сбора или в течение до 24 часов после сбора в случае хранения при комнатной температуре^{15,16,18,19}. Если обработка проводится не сразу после сбора, лаборатория должна подтвердить, что образцы, которые обрабатываются и хранятся в соответствии с процедурами данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, обработанных сразу после сбора.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендованное предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток¹³.

Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °С в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{14,15} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Предоставляемые реагенты

Реагент BD OneFlow PCST предоставляется в виде одноразовых пробирок в пакетах из фольги. В каждом наборе четыре пакета:

- два пакета, в каждом из которых по пять пробирок BD OneFlow PCST (S);
- два пакета, в каждом из которых по пять пробирок BD OneFlow PCST (C).

Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- BD OneFlow™ Assays Installer I (Инсталлятор I для анализов BD OneFlow™) (номер по каталогу 664225)

Для анализа OneFlow PCST необходимо использовать инсталлятор. Анализ содержит лист сбора данных, лабораторный отчет, отчет лечащего врача и дополнительный отчет, который используется для дальнейшего обследования. Если у вас еще нет текущей версии анализа OneFlow PCST, инсталлятор для анализов BD OneFlow необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow PCST. Инсталлятор также содержит анализы для других реагентов BD OneFlow™.

Руководство по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™ предоставляется вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Инсталлятор шаблонов для анализов BD OneFlow™ (номер по каталогу 659305)

Для шаблона OneFlow PCST необходимо использовать инсталлятор. Шаблон содержит два общих рабочих листа: рабочий лист OneFlow PCST Acquisition и рабочий лист OneFlow PCST Analysis. Если у вас еще нет текущей версии шаблона OneFlow PCST, инсталлятор необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow PCST. Инсталлятор также содержит шаблон OneFlow Setup и шаблоны для других реагентов BD OneFlow.

Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™ и Руководство по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток поставляются вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

- Конические полипропиленовые пробирки объемом 15 мл.
- Пастеровская пипетка.
- Серологическая пипетка.
- Микропипетка с наконечниками.
- Мешалка «вортекс».
- Центрифуга.
- Промывочный буфер (фильтрованный PBS + 0,5 % BSA + 0,09 % или 0,1 % азида натрия).
- Набор для фиксации и пермеабиллизации клеток FIX & PERM®.

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- Гранулы BD CS&T Beads (номер по каталогу 656504 или 656505).
- Семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit (№ по каталогу 656867).
- Пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit (№ по каталогу 661564).

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads (номер по каталогу 656046 или 656047).
- Настрочные гранулы BD OneFlow Setup Beads (номер по каталогу 658620).
- Восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow (номер по каталогу 658621).

8. ПРОЦЕДУРА

Установка анализа или шаблона OneFlow PCST

Анализ OneFlow PCST, используемый с программным обеспечением BD FACSuite Clinical, или шаблон OneFlow PCST, используемый с программным обеспечением BD FACSDiva, необходимо установить до первого запуска анализа. Одновременно с этим при необходимости можно установить дополнительные анализы или шаблоны. Если анализ файлов FCS осуществляется на отличной от использовавшейся для сбора данных образцов рабочей станции, анализы или шаблоны необходимо установить на обе рабочие станции.

Для установки анализа OneFlow в программном обеспечении BD FACSuite Clinical необходимо выполнить следующие действия.

1. Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.
Откроется мастер установки анализов BD OneFlow InstallShield.

-
- Щелкните **Next** (Далее).

Откроется лицензионное соглашение.

- Выберите вариант **I accept the terms in the license agreement** (Я принимаю условия лицензионного соглашения) и нажмите **Next** (Далее).

- Чтобы установить все анализы, имеющиеся на инсталляторе, выберите опцию **Complete** (Полная установка) и нажмите **Next** (Далее).

- Необязательно: Чтобы установить анализы, имеющиеся на инсталляторе, выборочно, укажите вариант **Custom** (Пользовательская установка) и нажмите **Next** (Далее).

Откроется диалоговое окно **Custom Setup** (Пользовательская настройка).

- Нажмите на меню слева от соответствующего анализа.
- В меню выберите **This assay will be installed on your local hard drive** (Этот анализ будет установлен на жесткий диск).

- Нажмите **Install** (Установить).

Анализы будут установлены в Library (Библиотека).

- Выберите **Finish** (Готово).

Мастер установки анализов InstallShield закроется.

- Необязательно: дважды щелкните ознакомительный файл (ReadMe), расположенный на инсталляторе.

Откроется ознакомительный файл (ReadMe).

- Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.

- Извлеките инсталлятор.

Для установки шаблона OneFlow в программном обеспечении BD FACSDiva необходимо выполнить следующие действия.

ПРИМЕЧАНИЕ При выборе шаблона для установки он записывается поверх шаблона с таким же именем, если таковой был установлен в системе. Если вы не хотите, чтобы имеющийся на вашем компьютере шаблон был перезаписан, не выбирайте этот шаблон в установщике в процессе установки.

Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.

1. Следуйте инструкциям в диалоговом окне.

Инсталлятор скопирует и вставит шаблоны в папку
D:\BDExport\Templates\Panel\BD Panels.

ПРИМЕЧАНИЕ Если в вашей системе всего один жесткий диск, шаблоны будут установлены в папку
C:\BDExport\Templates\Panel\BD Panels.

По завершении установки откроется диалоговое окно с сообщением, какие шаблоны успешно скопированы в папку.

2. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть диалоговое окно.
3. Откроется ознакомительный файл инсталлятора (ReadMe). Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.
4. Извлеките инсталлятор.

Настройка цитометра

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

1. Для осуществления контроля качества определения характеристик (CQC) каждые 6 месяцев или по необходимости, ежедневного контроля качества работы (PQC), ежедневной настройки анализов и параметров пробирок используйте гранулы BD CS&T Beads и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.

-
2. Для обновления эталонных настроек каждые 60 дней используйте семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.

Обратитесь к *Инструкциям по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™ и BD FACSLytic™ Clinical Reference System* (Справочная клиническая система BD FACSLytic™), а также документации по соответствующему реагенту для получения дополнительной информации.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads (CS&T IVD Beads) и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для установки базового уровня цитометра и проведения ежедневных проверок работоспособности.
2. Используйте настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, лизированную промытую кровь и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной настройки напряжений фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) и детекторов светорассеяния.
3. Используйте гранулы BD FC Beads и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной установки компенсации флуоресценции.
4. Рекомендуется убедиться, что напряжения ФЭУ (PMTV) находятся в ежедневных целевых диапазонах.

Подробную информацию см. в *Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™* и документации по соответствующему реагенту.

Подготовка образца

Промывка образца

ПРИМЕЧАНИЕ Перед промывкой образца убедитесь, что цитометр правильно настроен.

1. Нанесите идентификатор образца на коническую пробирку объемом 15- мл.
2. Десять раз переверните пробирку с образцом, чтобы как следует перемешать ее содержимое.
3. Добавьте в помеченную коническую пробирку 300 мкл образца.
4. Добавьте 10 мл промывочного буфера (фильтрованный PBS + 0,5 % BSA + 0,1 % азида натрия).
5. Переверните пробирку 3–5 раз, чтобы как следует перемешать ее содержимое.
6. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
7. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок.
8. Перед добавлением промывочного буфера встряхните пробирку на «вортексе», чтобы не осталось клеточных агрегатов.
9. Повторите шаги 4–8 еще два раза — итого три промывки.
10. Ресуспенсируйте клеточный осадок в 200 мкл промывочного буфера до конечного объема приблизительно 300 мкл.
11. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы полностью ресуспендировать клеточный осадок.

ПРИМЕЧАНИЕ Приступите к окрашиванию образца при помощи пробирки BD OneFlow PCST в течение 30 минут после последней промывки. До окрашивания храните промытый образец при 20–25 °C.

Окрашивание образца

12. Если пакет хранился в холодильнике, не открывайте пакет, пока он не нагреется до комнатной температуры.

ПРИМЕЧАНИЕ Реагент очень чувствителен к влаге. Во избежание образования конденсата открывайте пакет, только если его температура равна комнатной.

13. Для каждого образца пациента извлеките пробирку BD OneFlow PCST (S) из соответствующего пакета и немедленно закройте пакет. Пробирку BD OneFlow PCST (C) пока не извлекайте.
14. Поместите пробирки в штатив, защищенный от света.

Приступите к окрашиванию образца в течение часа после изъятия пробирки из пакета.

15. Немедленно закройте пакет с неиспользованными пробирками.

ПРИМЕЧАНИЕ Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

16. Напишите идентификатор пациента в соответствующем месте на этикетке пробирки BD OneFlow PCST (S).

ПРИМЕЧАНИЕ Вскрыв пакет, напишите на этикетке пакета текущую дату. Используйте все пробирки из пакета в течение месяца, прежде чем вскрывать новый.

17. Встряхните промытый образец на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать.
18. Добавьте в пробирку 50 мкл промывочного буфера и 50 мкл промытого образца. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
19. Инкубируйте в течение 30 минут при 20–25 °C в темноте.

-
20. Добавьте 1,5 мл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
 21. Добавьте еще 1,5 мл промывочного буфера. Аккуратно встряхните на «вортексе», чтобы перемешать содержимое.
 22. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
 23. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
 24. Энергично встряхните на «вортексе» до полного ресуспендирования клеточного осадка.
 25. Добавьте в пробирку 100 мкл фиксирующего раствора FIX & PERM Reagent A. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
 26. Инкубируйте в течение 15 минут при 20–25 °C в темноте.
 27. Добавьте 1,5 мл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
 28. Добавьте еще 1,5 мл промывочного буфера. Аккуратно встряхните на «вортексе», чтобы перемешать содержимое.
 29. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
 30. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
 31. Энергично встряхните на «вортексе» до полного ресуспендирования клеточного осадка.

ПРИМЕЧАНИЕ Если получить суспензию отдельных клеток не удастся, ознакомьтесь с разделом «Поиск и устранение неисправностей».

-
32. Измерьте объем в каждой пробирке при помощи пипетки и добавьте промывочный буфер до конечного объема 100 мкл в каждой пробирке. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.

ПРИМЕЧАНИЕ Очень важно обеспечить конечный объем 100 мкл в каждой пробирке, чтобы все клетки были полностью пермеабиллизированы во время этапов 21–23.

33. Извлеките необходимое количество пробирок BD OneFlow PCST (C) из пакета и немедленно закройте пакет.

ВНИМАНИЕ! Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

ПРИМЕЧАНИЕ Напишите идентификатор пациента в соответствующем месте на этикетке пробирки BD OneFlow PCST (C). Вскрыв пакет, напишите на этикетке пакета текущую дату. Используйте все пробирки из пакета в течение месяца, прежде чем вскрывать новый.

34. Добавьте 100 мкл пермеабиллизующего раствора FIX & PERM Reagent B в пробирку BD OneFlow PCST (C).
35. Перенесите 100 мкл образца из пробирки BD OneFlow PCST (S) в соответствующую пробирку BD OneFlow PCST (C).

ПРИМЕЧАНИЕ Номера идентификаторов пациента на обеих пробирках должны совпадать.

36. Энергично встряхните на «вортексе» пробирку BD OneFlow PCST (C) в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
37. Инкубируйте в течение 15 минут при 20–25 °C в темноте.

38. Добавьте 1,5 мл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
39. Добавьте еще 1,5 мл промывочного буфера. Аккуратно встряхните на «вортексе», чтобы перемешать содержимое.
40. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
41. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
42. Добавьте в пробирку 200 мкл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы полностью ресуспендировать клеточный осадок.

ПРИМЕЧАНИЕ Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °C в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLyric)

Добавьте идентификатор партии реагента и срок годности в библиотеку следующим образом.

1. На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок Library (Библиотека).
Откроется рабочая область Library (Библиотека).
2. Откройте меню **Beads and Reagents** (Гранулы и реагенты) и выберите **Reagents** (Реагенты).

3. В списке **Product Name** (Наименование изделия) выберите OneFlow PCST.

В нижней части страницы появится панель **OneFlow PCST**.

4. Щелкните **Add Lot** (Добавить партию).

Откроется диалоговое окно **Add New Lot** (Добавить новую партию).

5. Вручную введите **Lot ID** (Идентификатор партии), указанный на этикетке пробирки.
6. Нажмите на значок календаря и выберите на календаре дату истечения срока годности, указанную на этикетке пробирки.
7. Установите флажок **Current Lot** (Текущая партия).
8. Нажмите **OK**.

Идентификатор партии и срок годности будут добавлены в соответствующие поля сведений о реагенте.

ПРИМЕЧАНИЕ Убедитесь, что идентификатор партии реагента и срок годности добавлены в сведения о реагенте до начала сбора данных образцов. Эту процедуру необходимо выполнить только один раз для одной партии реагентов.

Порядок создания рабочей процедуры:

1. На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок Worklists (Рабочие процедуры).

Откроется рабочая область Worklists (Рабочие процедуры).

2. На вкладке **Manage Worklists** (Управление рабочими процедурами) нажмите кнопку **New** (Новая).

В новой вкладке откроется пустая рабочая процедура.

3. В разделе **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры) выберите в меню **Task** (Задача) нужную задачу.

4. Для задач, связанных с реагентами OneFlow, введите **Sample ID** (Идентификатор образца) вручную.

Не сканируйте штрихкод на этикетке пробирки в программное обеспечение.

ПРИМЕЧАНИЕ Разные партии одного реагента нельзя использовать в рамках одной рабочей процедуры.

5. В разделе **Loading Options** (Параметры загрузки) выберите **Manual** (Вручную) в меню **Loading Option** (Параметры загрузки).

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)

1. В строке меню выберите **Edit > User Preferences** (Редактировать > Настройки пользователя), перейдите на вкладку **FCS** и выберите **Export FCS after recording** (Экспорт FCS после записи) для автоматического экспорта файлов FCS после сбора данных. Нажмите **OK**.
2. Убедитесь, что выбрана конфигурация цитометра BD по умолчанию 4-2H-2V.
3. В строке меню выберите **Experiment > New Experiment > Blank Experiment** (Эксперимент > Новый эксперимент > Пустой эксперимент). Нажмите **OK**.

ПРИМЕЧАНИЕ Также эксперимент можно создать непосредственно из окна **Browser** (Средство просмотра), щелкнув значок **Experiment** (Эксперимент).

4. Если отображается диалоговое окно **CST Mismatch** (Несовпадение CST), выберите **Use CST Settings** (Использовать параметры CST).
5. Переименуйте эксперимент в соответствии с правилами лаборатории.

-
6. В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Link Setup** (Настройки цитометра > Привязать настройки) и выберите соответствующую матрицу компенсации, рассчитанную с использованием гранул BD FC Beads в течение последних 31 суток. Щелкните **Link** (Привязать). См. инструкцию по эксплуатации восьмицветного комплекта гранул *BD® FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow™* или *Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™*.
 7. Если отображается диалоговое окно **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), выберите **Overwrite** (Перезаписать).
 8. Щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Unlink From** (Настройки цитометра > Отменить связь с) и выберите ранее привязанную настройку компенсации. Нажмите **OK**.

ПРИМЕЧАНИЕ Отмена связи с настройкой компенсации позволяет применить обновленные параметры приложения, сохранив значения компенсации.

9. В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Application Settings > Apply** (Настройки цитометра > Параметры приложения > Применить) и выберите самые последние параметры приложения, определенные за последние 31 сутки с использованием настроечных гранул BD OneFlow Setup Beads. Щелкните **Apply** (Применить).
10. Откроется диалоговое окно **Confirm** (Подтвердить). Выберите **Keep the compensation value** (Сохранить значение компенсации).
11. При появлении диалогового окна **Confirm Cytometer Changes** (Подтвердить изменения настроек цитометра) щелкните **Yes** (Да), чтобы перезаписать значения настроек цитометра для **FSC Area Scaling** (Масштабирование области FSC).

-
12. В строке меню выберите **Experiment > New Specimen** (Эксперимент > Новый образец).

Откроется диалоговое окно **Panel Templates** (Шаблоны панели).

13. Перейдите на вкладку **BD Panels** (Панели BD) и выберите шаблон **OneFlow PCST**.

ПРИМЕЧАНИЕ Необходимо выбрать шаблон той пробирки, сбор данных которой производится.

14. Укажите количество образцов пациентов, для которых необходимо выполнить сбор данных, в поле **Copies** (Копии) внизу вкладки **BD Panels** (Панели BD). Нажмите **OK**.

15. Переименуйте образцы, например укажите соответствующие идентификаторы пациента перед названиями образцов.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости повторить запуск конкретного образца пациента установите указатель текущей пробирки на пробирку, запуск которой нужно повторить. Нажмите кнопку **Next Tube** (Следующая пробирка) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы создать еще одну пробирку для этого пациента. Не используйте для создания дополнительной пробирки пункт меню **Experiment > New Tube** (Эксперимент > Новая пробирка) или значок **New Tube** (Новая пробирка) в строке меню **Browser** (Средство просмотра), поскольку в таком случае поля этикеток и штрихкода заполнены не будут.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости выполнить сбор данных для других образцов пациентов в данном эксперименте повторите шаги 12–15, чтобы добавить новые образцы. Откроются два диалоговых окна **Confirm** (Подтвердить) с вопросами, хотите ли вы создать еще один рабочий лист сбора данных PCST или рабочий лист анализа данных PCST. Нажмите **Cancel** (Отмена) в каждом диалоговом окне.

-
16. В строке меню выберите **Experiment > Experiment Layout** (Эксперимент > План эксперимента) и перейдите на вкладку **Keywords** (Ключевые слова).
 17. Выделите ключевое слово **Product ID** (Идентификатор продукта) для соответствующей пробирки и отсканируйте штрихкод на этикетке пробирки BD OneFlow PCST (C).

ПРИМЕЧАНИЕ Если отсканировать штрихкод на этикетке пробирки не удается, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

18. Вручную добавьте необходимую информацию в оставшиеся ключевые слова.
19. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть **Experiment Layout** (План эксперимента).

Сбор данных окрашенного образца

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

Анализ автоматически соберет 100 000 событий. После начала сбора данных невозможно изменить количество событий. Поэтому, если необходимо изменить количество событий, сделайте это до начала сбора данных. Инструкции по изменению количества событий для сбора см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

Чтобы собрать данные образца, выполните следующие действия.

1. Нажмите **Run All** (Выполнить все) в меню **Run** (Выполнить) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы выполнить рабочую процедуру с самого начала.

Либо, чтобы собрать данные для конкретной пробирки, наведите указатель выполнения на образец, для которого необходимо выполнить сбор, и нажмите **Run from Pointer** (Выполнить, начиная с положения указателя) в меню **Run** (Выполнить).

2. Встряхните каждую окрашенную пробирку на «вортексе» в течение 3–5 секунд на низкой скорости непосредственно перед сбором данных пробирки.
3. Следуйте подсказкам в программном обеспечении, чтобы загрузить или извлечь пробирки.
Откроется рабочий лист сбора данных OneFlow PCST Acquisition. Рабочий лист сбора данных содержит точечные графики и гейты, позволяющие идентифицировать клетки, клетки CD38⁺ и В-клетки.
4. Исследуйте каждый точечный график на рабочем листе сбора данных.

ПРИМЕЧАНИЕ Время предварительного просмотра составляет 10 секунд, затем данные записываются автоматически.

Не увеличивайте время предварительного просмотра и не используйте недостаточный объем образца во избежание риска его потери.

5. Если предполагается собрать менее 100 000 событий, отслеживайте объем образца и нажмите **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор данных до опустошения пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Анализ автоматически соберет 100 000 событий. Если это невозможно, сбор прекращается по истечении 5 минут. Однако необходимо отслеживать объем образцов и нажать **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор до опустошения пробирки. Инструкции по изменению критериев остановки см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. Встряхните клетки на «вортексе» в течение 3–5 секунд на низкой скорости непосредственно перед сбором данных пробирки на проточном цитометре.
2. В окне **Browser** (Средство просмотра) разверните соответствующий образец и установите указатель текущей пробирки на нужную.
3. Установите пробирку в цитометр. Установите скорость потока на **Medium** (Средняя) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных). Щелкните **Acquire Data** (Сбор данных).
4. Убедитесь, что популяция охвачена шкалой, и отрегулируйте гейт на первом графике рабочего листа **BD OneFlow PCST Acquisition**, чтобы исключить примеси, если необходимо.
5. Щелкните **Record Data** (Регистрировать данные) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы собрать нужное количество событий.

ПРИМЕЧАНИЕ Шаблон автоматически соберет 100 000 событий². При необходимости используйте меню в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы выбрать другое количество событий для сбора. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

6. Изучите точечные графики на рабочем листе сбора данных PCST и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Для идентификации клеток используется точечный график FSC-A против SSC-A.

Точечный график CD38 FITC-A против CD45 V450-A используется для идентификации клеток CD38⁺.

Точечный график CD19 PE-Cy7-A против SSC-A используется для идентификации В-клеток.

Точечные графики для оставшихся маркеров гейтов не содержат и включены в качестве гарантии окрашивания антителами клеток образца, то есть внутреннего контроля качества окрашивания пробирки.

Изучите точечные графики α IgK APC-A против α IgL APC-H7-A для оценки клональности клеток CD38⁺ и В-клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток на рабочем листе сбора данных PCST см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток*.

7. Соберите данные следующего образца.
8. В строке меню выберите **File > Export > Experiments** (Файл > Экспортировать > Эксперименты) и выберите параметр **Directory Export** (Экспортировать каталог). Нажмите **ОК**.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical

1. Наведите указатель выполнения на соответствующий образец на панели **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры).

OneFlow PCST Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow PCST) откроется во вкладке **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).

2. Ознакомьтесь с OneFlow PCST Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow PCST).

На первой странице лабораторного отчета представлена информация об образце и пробирке, статистика популяции и сообщения КК, при наличии.

ПРИМЕЧАНИЕ Для популяций с недостаточным числом событий строки %Parent (%Исходная) или %Grandparent (%Исходная исходной) могут отображаться со значением 0,0 %. Это происходит из-за округления результата до одного знака после запятой в программном обеспечении BD FACSuite Clinical.

3. Изучите точечные графики на 2-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 2-й странице лабораторного отчета представляют клеточный анализ высокого уровня, идентифицируя клетки, одиночные события FSC, одиночные события SSC и В-клетки.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

-
4. Изучите точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета используются для анализа плазматических клеток в образце. Представлены точечные графики и гейты, позволяющие идентифицировать клетки CD38⁺, плазматические клетки, клетки cyIgG^+ и cyIgK^+ . Оставшиеся точечные графики характеризуют популяции cyIgG^+ и cyIgK^+ .

5. Изучите 4-ю страницу лабораторного отчета.

На 4-й странице лабораторного отчета представлена информация о номере партии и сроке годности гранул BD CS&T Beads и реагента BD OneFlow, настройках контрольных значений, настройках пробирок и конфигурации цитометра.

6. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Physician Report** (Отчет для лечащего врача), чтобы просмотреть отчет.

OneFlow PCST Physician Report (Отчет OneFlow PCST для лечащего врача) содержит общую сводку результатов анализа.

7. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Supplemental Report** (Дополнительный отчет), чтобы включить дополнительные точечные графики для дальнейшего анализа образца.

Дополнительную информацию см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые области с гейтами, удаленные в этом дополнительном отчете, отражаются в лабораторном отчете и отчете для лечащего врача. Любые области с гейтами, созданные в этом дополнительном отчете, должны быть отражены в лабораторном отчете.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Не добавляйте точечные графики и гейты в лабораторный отчет или отчет для лечащего врача. Их невозможно удалить, и они сделают отчет недействительным.

8. Перейдите на вкладку **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).
9. Щелкните **Approved** (Утверждено).

Откроется диалоговое окно **ESignature** (Электронная подпись).

10. Выберите идентификационный номер пользователя.
11. Введите пароль.
12. Дополнительно: введите комментарии.
13. Щелкните **Sign** (Подписать).

В поле E-signature (Электронная подпись) всех трех отчетов добавляются идентификационный номер пользователя, подписавшего отчеты, дата и время подписания, а также комментарии.

Дополнительные сведения и информацию о вариантах экспорта см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLyric™*.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva

1. В строке меню выберите **File > Import > Experiments** (Файл > Импортировать > Эксперименты).
2. Выберите эксперимент, который нужно проанализировать. Щелкните **Import** (Импортировать).

Откроется эксперимент с соответствующими рабочими листами сбора и анализа данных.

-
3. Выберите вкладку рабочего листа **BD OneFlow PCST Analysis** (данных BD OneFlow PCST).
 4. Изучите точечные графики на 1-й странице рабочего листа анализа данных PCST и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Первые три точечных графика на 1-й странице рабочего листа анализа данных идентифицируют одиночные события по FSC и SSC. Клеточные обломки и слипшиеся клетки исключаются регулировкой гейтов.

Клетки CD38⁺ идентифицируются на точечном графике CD38 FITC-A против CD45 V450-A, а затем плазматические клетки идентифицируются на точечном графике CD38 FITC-A против CD138 V500-A. Плазматические клетки затем характеризуются путем гейтирования клеток, экспрессирующих cyIgk и $\text{cyIg}\lambda$. Эти три точечных графика также приведены для справки наверху 2-й страницы рабочего листа анализа данных PCST. Точечный график CD38 FITC-A против SSC-A приведен для сведения в целях визуализации клеток CD38^{ярк}.

В-клетки идентифицируются на точечном графике CD19 PE-Cy7-A против SSC-A и затем характеризуются на точечном графике cyIgK APC-A против cyIgL APC-H7-A.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток*.

- Изучите точечные графики на 2-й странице рабочего листа анализа данных PCST.

Плазматические клетки cyIgK^+ и $\text{cyIg}\lambda^+$ дополнительно характеризуются по уровню экспрессии CD19, CD45, CD56 и $\beta 2$ -микроглобулина.

- Изучите результаты в таблице статистики на стр. 3 рабочего листа анализа данных PCST.

Убедитесь, что в таблице статистики присутствуют все ключевые слова. Если какие-либо ключевые слова отсутствуют, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

- Выполните дальнейшие анализы по мере необходимости.

ПРИМЕЧАНИЕ На точечных графиках рабочего листа анализа данных PCST представлены гейты для нормальных клеточных популяций. Если анализ выявил клеточные популяции за пределами предложенных гейтов, они могут оказаться аномальными и потребовать дальнейшего анализа.

- Сохраните рабочий лист анализа данных PCST в формате PDF.

ПРИМЕЧАНИЕ Рабочий лист анализа данных PCST — это общий рабочий лист. При изменении гейтов в ходе анализа образца в общем рабочем листе таковые будут изменены в ранее проанализированных файлах. Сохраненные файлы PDF изменены не будут, но при возвращении к ранее проанализированному общему рабочему листу придется вернуть гейты на прежнее место.

-
9. (Необязательно.) Щелкните **Print** (Печать), чтобы напечатать рабочий лист анализа данных как PDF.
 10. Выполните анализ следующего образца.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Использование терапевтических моноклональных антител для лечения пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.
- Использование данного реагента для диагностической оценки нарушений со стороны кроветворной системы возможно лишь в контексте тщательного иммунофенотипического анализа, включающего другие релевантные маркеры.
- Для использования реагента BD OneFlow PCST необходимо обладать опытом иммунофенотипирования и классификации лейкоцитов и лимфом. Результаты должен интерпретировать патолог или аналогичный специалист с учетом других клинических и лабораторных данных.
- Эффективность реагента BD OneFlow PCST при тестировании образцов пациентов с минимальной остаточной болезнью (МОБ) не установлена.
- Не используйте образцы сомнительного качества, в том числе свернувшиеся, гемолизированные, замороженные и охлажденные образцы.
- Испытания работы BD OneFlow PCST с универсальным загрузчиком BD FACSTM Universal Loader не проводились.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Проточный цитометр BD FACSLytic

Исследования прецизионности для воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow PCST были выполнены в исследовательском центре BD Research Centre в Ирландии.

Воспроизводимость и повторяемость (проточный цитометр BD FACSLytic)

В одном центре проведено 5-дневное исследование воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow PCST с использованием контрольного материала. Использовались два источника контрольного материала: контрольные образцы BD® Multi-Check Control и CD-Chex CD103 Plus®, чтобы оценить все маркеры, распознаваемые антителами в реагенте BD OneFlow PCST. Оценка прецизионности проводилась между тремя проточными цитометрами BD FACSLytic тремя операторами, которые собирали данные контрольных материалов. Каждый оператор окрашивал два контрольных образца с использованием трех партий BD OneFlow PCST. Каждый оператор выполнял по два независимых тестирования в каждый из 5 дней оценки.

Было определено процентное содержание восьми субпопуляций, приведенных в следующих таблицах. В таблицах показано среднее значение, среднеквадратичное отклонение (SD), %CV (коэффициент вариации) и верхний 95%-й доверительный предел (CL) воспроизводимости (воспроизводимости между операторами / между приборами и операторами / между приборами, между партиями, между тестированиями, между днями) и повторяемости (прецизионности в пределах тестирования) для каждого процентного содержания субпопуляций.

Табл. 3. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
Клетки CD56 ⁺ cells (% лимфоцитов)	11,92	0,84	0,95	7,02	7,89
CD19 (% одиночных событий SSC)	4,56	0,08	0,09	1,78	2
IgK (% В-клеток)	58,14	1,39	1,59	2,39	2,69
IgL (% В-клеток)	39,1	1,29	1,47	3,3	3,71

Табл. 4. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
Клетки CD56 ⁺ cells (% лимфоцитов)	11,92	0,73	0,83	6,11	6,87
CD19 (% одиночных событий SSC)	4,56	0,16	0,19	3,58	4,02
IgK (% В-клеток)	58,14	2,32	2,65	3,98	4,48
IgL (% В-клеток)	39,1	2,32	2,65	5,93	6,67

Сравнение методов (для проточных цитометров BD FACSLyric)

Было проведено сравнительное исследование использования системы BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLyric (исследуемый метод) и BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSCanto II (сравнительный метод) в 4 клинических центрах. Система BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLyric включает гранулы BD CS&T Beads, семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit и BD OneFlow PCST со сбором данных на десятицветном проточном цитометре BD FACSLyric (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) с использованием программного обеспечения BD FACSuite Clinical версии 1.3[†] и анализа

OneFlow PCST. Эталонная система BD OneFlow на BD FACSCanto II включает гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads, настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow Assay и BD OneFlow PCST со сбором данных на проточном цитометре BD FACSCanto II (4-2H-2V) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva версии 8.0.2 и шаблона OneFlow PCST. Всего в исследовании использовалось 80 оцениваемых образцов костного мозга. Образцы были собраны с использованием указанных антикоагулянтов. См. табл. 5.

Табл. 5. Антикоагулянты, использованные для сбора образцов

Тип образца	Антикоагулянт	
	ЭДТА	Гепарин
Аномальные плазматические клетки	41	1
Нормальные поликлональные плазматические клетки	35	3
Всего	76	4

Для всех образцов в исследовании первый этап промывки начался в течение 24 часов после сбора. Сбор данных всех окрашенных образцов выполнялся в течение 45 минут после окончательного ресуспендирования. Для всех образцов в исследовании количество событий плазматических клеток и процентное содержание находились в указанных пределах. См. табл. 6.

Табл. 6. Пределы событий и процентного содержания плазматических клеток

Плазматические клетки	Диапазон
Количество событий	12–38 065

† Проведено исследование регрессии, продемонстрировавшее эквивалентность программного обеспечения BD FACSuite Clinical версий 1.3 и 1.4.

Табл. 6. Пределы событий и процентного содержания плазматических клеток

Плазматические клетки	Диапазон
% одиночных событий SSC	0–42,4 %

Образцы были идентифицированы как «Аномальные плазматические клетки» или «Нормальные поликлональные плазматические клетки» с использованием двух систем и сопоставлены.

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

Общий % согласованности = $((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100$

% положительной согласованности = $(a / (a + c)) \times 100$

% отрицательной согласованности = $(d / (d + b)) \times 100$

где

a = количество образцов, идентифицированных как «Аномальные плазматические клетки» согласно обеим системам;

b = количество образцов, идентифицированных как «Аномальные плазматические клетки» на проточном цитометре BD FACSLyric и «Нормальные поликлональные плазматические клетки» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

c = количество образцов, идентифицированных как «Нормальные поликлональные плазматические клетки» на проточном цитометре BD FACSLyric и «Аномальные плазматические клетки» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

d = количество образцов, идентифицированных как «Нормальные поликлональные клетки» согласно обеим системам.

Результаты анализа образцов, идентифицированных как «Аномальные плазматические клетки» или «Нормальные поликлональные плазматические клетки», были сведены в таблицу. См. табл. 7.

Табл. 7. Согласованность для образцов, идентифицированных как «Аномальные плазматические клетки» или «Нормальные поликлональные плазматические клетки»

		Сравнительный метод (проточный цитометр BD FACSCanto II)		Всего
		Аномальные плазматические клетки	Нормальные поликлональные плазматические клетки	
Исследуемый метод (BD FACSLytic)	Аномальные плазматические клетки	42	0	42
	Нормальные поликлональные плазматические клетки	0	38	38
	Всего	42	38	80

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 96,32 %.

Положительная согласованность для «Аномальных плазматических клеток» составляет 100 %. Отрицательная согласованность для «Нормальных поликлональных плазматических клеток» составляет 100 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSLytic)

Количественная оценка указанных клеточных популяций, выраженная как процент от указанной клеточной популяции, была выполнена для каждого оцениваемого образца, участвующего в исследовании сравнения методов. Был проведен анализ образцов с использованием системы BD OneFlow с проточным цитометром BD FACSLytic и с проточным цитометром BD FACSCanto II, как описано ранее.

Для всех оцениваемых образцов была рассчитана средняя систематическая ошибка для всех клеточных популяций, выраженных как процент от указанной клеточной популяции, определенных на проточном цитометре BD FACSLytic и проточном цитометре BD FACSCantoII. См. табл. 8.

Табл. 8. Обзор средней систематической ошибки для процентного содержания субпопуляций

Популяция	Количество образцов ^a	Средняя систематическая ошибка	Нижний 95%-й CL средней систематической ошибки	Верхний 95%-й CL средней систематической ошибки
Плазматические клетки (% одиночных событий SSC)	80	-0,04	-0,14	0,06
cyIgKappa (% плазматических клеток)	80	-2,03	-3,37	-0,69
cyIgLambda (% плазматических клеток)	80	-0,55	-1,71	0,62

а. Некоторые образцы, возможно, были исключены из-за того, что было собрано мало событий.

Результаты сравнения методов и исследований эквивалентности свидетельствуют, что эти две системы по существу эквивалентны.

Проточный цитометр BD FACSCanto II

Исследования воспроизводимости и повторяемости анализов с использованием BD OneFlow PCST были выполнены в лабораториях компании BD Biosciences в городе Сан-Хосе, штат Калифорния (США).

Воспроизводимость (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Два оператора выполняли по две независимые серии анализов в течение восьми дней на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II по очереди. Воспроизводимость CD38, CD56, $\beta 2$ -микроглобулина, CD19, Anti-Kappa, Anti-Lambda и CD45 оценивалась с использованием контроля BD Multi-Check. Воспроизводимость CD138 оценивалась с использованием костного мозга. Для каждой серии анализов каждым оператором было выполнено окрашивание двух контрольных образцов (контроля BD Multi-Check Control или костного мозга) с использованием трех партий BD OneFlow PCST, сбор данных с использованием рабочего листа BD OneFlow PCST Acquisition и анализ с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Было определено процентное содержание клеточных популяций, положительно окрашенных на CD38, CD56, $\beta 2$ -микроглобулин, CD19, Anti-Kappa, Anti-Lambda и CD45, в исходной популяции (субпопуляция %P). Было определено процентное содержание клеток CD138⁺ в популяции плазматических клеток CD38^{ярк}. (субпопуляция %CD38^{ярк}.) в костном мозге. Общая воспроизводимость по показателю «Субпопуляция %P» была рассчитана для каждого антитела. Общая воспроизводимость включает четыре компонента: между оператором/прибором и оператором/прибором, между партиями, между анализами и между днями. См. Табл. 9.

Табл. 9. Воспроизводимость субпопуляции %P

Популяция	DF ^a	SD ^b	%CV ^c	UCL ^d
CD56 ⁺	95	1,45	11,2	12,56
$\beta 2$ -микроглобулин ⁺	95	0,15	0,15	0,17
CD19 ⁺	95	0,49	3,27	3,66
cyIgk ⁺	95	0,97	1,73	1,94
cyIgl ⁺	95	0,73	1,86	2,08

Табл. 9. Воспроизводимость субпопуляции %P

Популяция	DF ^a	SD ^b	%CV ^c	UCL ^d
CD45 ⁺	95	1,14	1,19	1,33
CD38 ⁺	95	1,23	11,81	13,24

a. DF = степени свободы

b. SD = среднее квадратичное отклонение

c. %CV = коэффициент вариации в процентах

d. UCL = верхний доверительный предел доверительного интервала 95 %

Общая воспроизводимость субпопуляции %CD38^{ярк} включает три первых компонента из описанных выше, а также воспроизводимость между донорами. См. табл. 10.

Табл. 10. Воспроизводимость субпопуляции %CD38^{ярк}.

Популяция	DF	SD	%CV	UCL
CD138 ⁺	88	7,53	13,58	15,30

Повторяемость (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Два оператора выполняли по две независимые серии анализов в течение восьми дней на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II по очереди. Повторяемость CD38, CD56, β 2-микроглобулина, CD19, Anti-Kappa, Anti-Lambda и CD45 оценивалась с использованием контроля BD Multi-Check. Повторяемость CD138 оценивалась с использованием костного мозга. Для каждой серии анализов каждым оператором было выполнено окрашивание двух контрольных образцов (контроля BD Multi-Check Control или костного мозга) с использованием трех партий BD OneFlow PCST, сбор данных с использованием рабочего листа BD OneFlow PCST Acquisition и анализ с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Было определено процентное содержание клеточных популяций, положительно окрашенных на CD38, CD56, β 2-микроглобулин, CD19,

Anti-Kappa, Anti-Lambda и CD45, в исходной популяции (субпопуляция %P). Было определено процентное содержание клеток CD138⁺ в популяции плазматических клеток CD38^{ярк.} (субпопуляция %CD38^{ярк.}) в костном мозге. Внутриааналитическая сходимость (повторяемость между пробирками) по показателю «Субпопуляция %P» была рассчитана для каждого антитела. См. табл. 11.

Табл. 11. Повторяемость субпопуляции %P

Популяция	DF	SD	%CV	UCL
CD56 ⁺	96	0,33	2,56	2,87
β2-микроглобулин ⁺	96	0,08	0,08	0,09
CD19 ⁺	96	0,28	1,84	2,05
cyIgκ ⁺	96	0,87	1,55	1,74
cyIgλ ⁺	96	0,82	2,08	2,33
CD45 ⁺	96	0,26	0,27	0,30
CD38 ⁺	96	0,24	2,34	2,62

Для CD138 была рассчитана повторяемость популяции %CD38^{ярк.} между пробирками. См. табл. 12.

Табл. 12. Повторяемость субпопуляции %CD38^{ярк.}

Популяция	DF	SD	%CV	UCL
CD138 ⁺	96	2,85	5,13	5,75

Согласованность (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Было проведено сравнительное исследование работы системы BD OneFlow PCST с проточным цитометром BD FACSCanto II и системы EuroFlow PCST с проточным цитометром BD FACSCanto II. 48 образцов костного мозга было собрано в 2 внешних клинических

центрах. Система BD OneFlow PCST включает настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, гранулы BD FC Beads для компенсации и реагент BD OneFlow PCST. Эталонная система EuroFlow PCST состоит из калибровочных частиц Sphero™ Rainbow (8 пиков), окрашенных в один цвет клеток с гранулами BD® CompBead для компенсации и смеси реагентов EuroFlow PCST. 48 образцов костного мозга были разделены на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны» с использованием двух систем. Было выполнено сравнение результатов. Образцы из группы «Необходимы дополнительные анализы» затем были разделены по принадлежности к линии плазматических клеток или другой клеточной линии.

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

Общий % согласованности = $((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100$

где

a = количество образцов, которые относятся к группе «Необходимы дополнительные анализы» согласно обеим системам;

b = количество образцов, которые согласно системе BD OneFlow относятся к группе «Необходимы дополнительные анализы», а согласно системе EuroFlow — к группе «Дополнительные анализы не нужны»;

c = количество образцов, которые согласно системе BD OneFlow относятся к группе «Дополнительные анализы не нужны», а согласно системе EuroFlow — к группе «Необходимы дополнительные анализы»;

d = количество образцов, которые относятся к группе «Дополнительные анализы не нужны» согласно обеим системам.

Результаты разделения клеток на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны» были представлены в форме таблицы. См. табл. 13.

Табл. 13. Согласованность разделения клеток на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны»

		Сравнительный метод (смесь Euroflow PCST)		Всего
		Необходимы дополнительные анализы	Дополнительные анализы не нужны	
Исследуемый метод (BD OneFlow PCST)	Необходимы дополнительные анализы	29	0	29
	Дополнительные анализы не нужны	0	19	19
	Всего	29	19	48

Общий % согласованности — 100 %.

Согласованность результатов, рассчитанных с нижним доверительным пределом 95 %, составила 93,9 %.

Результаты для образцов из группы «Необходимы дополнительные анализы» для линии плазматических клеток и из группы «Дополнительные анализы не нужны» для линии плазматических клеток были представлены в форме таблицы. См. табл. 14

Табл. 14. Согласованность для образцов из группы «Необходимы дополнительные анализы» для линии плазматических клеток и из группы «Дополнительные анализы не нужны» для линии плазматических клеток

		Сравнительный метод (смесь Euroflow PCST)		Всего
		Необходимы дополнительные анализы	Дополнительные анализы не нужны	
Исследуемый метод (BD OneFlow PCST)	Необходимы дополнительные анализы	22	0	22
	Дополнительные анализы не нужны	0	26	26
	Всего	22	26	48

Общий % согласованности — 100 %.

Согласованность результатов, рассчитанных с нижним доверительным пределом 95 %, составила 93,9 %.

Результаты для образцов из группы «Необходимы дополнительные анализы» для линии неплазматических клеток (другая клеточная линия) и из группы «Дополнительные анализы не нужны» для линии неплазматических клеток (другая клеточная линия) были представлены в форме таблицы. См. табл. 15

Табл. 15. Согласованность для образцов из группы «Необходимы дополнительные анализы» для линии неплазматических клеток (другая клеточная линия) и из группы «Дополнительные анализы не нужны» для линии неплазматических клеток (другая клеточная линия)

		Сравнительный метод (смесь Euroflow PCST)		Всего
		Необходимы дополнительные анализы	Дополнительные анализы не нужны	
Исследуемый метод (BD OneFlow PCST)	Необходимы дополнительные анализы	7	0	7
	Дополнительные анализы не нужны	0	41	41
	Всего	7	41	48

Общий % согласованности — 100 %.

Согласованность результатов, рассчитанных с нижним доверительным пределом 95 %, составила 93,9 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Образцы костного мозга, собранные в 2 внешних клинических лабораториях, были взяты у пациентов с болезнями плазматических клеток, у пациентов с другими гематологическими заболеваниями и у субъектов без гематологических отклонений. Парное сравнение образцов проводилось при помощи системы BD OneFlow PCST и системы EuroFlow PCST, описанных выше. Было определено процентное содержание плазматических клеток (CD45⁺, CD38⁺, CD138⁺) среди синглетов SSC. Было определено процентное содержание клеток cyIgk^+ (CD45⁺, CD38⁺, CD138⁺, cyIgk^+ , cyIgl^-) и клеток cyIgl^+ (CD45⁺, CD38⁺, CD138⁺, cyIgl^+ , cyIgk^-) в популяции плазматических клеток. Статистика регрессии Деминга свидетельствует, что результаты, полученные с использованием двух систем, по существу эквивалентны. См. табл. 16

Табл. 16. Эквивалентность системы BD OneFlow и системы EuroFlow

Маркер	Объем выборки	Свободный член	Коеффициент	Нижний 95%-й CL ^a коеффициента	Верхний 95%-й CL коеффициента
Плазматические клетки (% SSC)	48	-0,21	0,95	0,70	1,06
Клетки $\text{suIg}\kappa^+$ (% плазматических клеток)	46	5,85	0,97	0,85	1,04
Клетки $\text{suIg}\lambda^+$ (% плазматических клеток)	46	3,79	0,95	0,89	1,01

а. ДП = доверительный предел

11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблемы, связанные с подготовкой или окрашиванием клеток

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и клеток	Образец был чрезмерно пермеабиллизирован	Повторите окрашивание. Инкубируйте пробирку в пермеабиллизующем растворе FIX & PERM Reagent B не более 15 минут
	Плохое качество образца	Проверьте жизнеспособность клеток
	Образец слишком старый	Возьмите новый образец и немедленно его окрасьте
Цитоплазма окрашена тускло (Ig κ и Ig λ)	Неполная пермеабиллизация клеток	Повторите окрашивание. Тщательно измерьте объем образца на этапах фиксации и пермеабиллизации клеток, чтобы отношение объема фиксированного образца к пермеабиллизующему раствору FIX & PERM Reagent B составляло 1 : 1

Проблема	Возможная причина	Решение
Клетки слиплись после фиксации	Неполное ресуспендирование клеток перед фиксацией	Перед добавлением фиксирующего раствора FIX & PERM Reagent A встряхните пробирки на «вортексе», чтобы не осталось клеточных агрегатов
	Недостаточно тщательное промывание клеток после фиксации	После обработки фиксирующим раствором FIX & PERM Reagent A инкубируйте пробирки 2 минуты в темноте в промывочном буфере
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток
	Промытый образец не был окрашен в течение 30 минут после последней промывки	Приготовьте свежий образец и повторите окрашивание
	Пробирка BD OneFlow PCST слишком долго была на свету	Повторите окрашивание с использованием новой пробирки BD OneFlow PCST
	Сбор данных не был проведен в течение 1 часа после окрашивания	Повторите окрашивание свежего образца. Проведите сбор данных немедленно
Зарегистрировано слишком мало клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией. Повторите окрашивание и сбор данных
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора. Дополнительную информацию см. в руководстве по эксплуатации цитометра

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow PCST на проточных цитометрах BD FACSLytic

Проблема	Возможная причина	Решение
Собрано недостаточно нужных клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией. Повторите окрашивание и сбор данных
	Слишком низкое значение по умолчанию — 100 000 событий для сбора	Измените количество событий для сбора. Повторите окрашивание и сбор данных. См. <i>Руководство по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™</i> .
Аномальный точечный график FSC-A против SSC-A	Необходима настройка цитометра	Обратитесь в компанию BD Biosciences
Файл CSV и отчет не экспортируются автоматически	Номер партии реагента и срок годности не были вручную добавлены в библиотеку	1. Добавьте номер партии реагента и срок годности в библиотеку. 2. Экспортируйте файл CSV и PDF-отчет вручную. См. <i>Инструкции по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™</i>

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow PCST на проточных цитометрах BD FACSCanto II

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и клеток	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора. Подробнее см. в <i>Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™</i>
Некоторые точечные графики недоступны	Не выбраны FSC-H и SSC-H при создании параметров приложения	Убедитесь, что FSC-H и SSC-H выбраны на вкладке Parameters (Параметры) окна Inspector (Инспектор)

Проблема	Возможная причина	Решение
Не удается отсканировать штрихкод на этикетке пробирки BD OneFlow PCST (C)	Штрихкод на этикетке пробирки испорчен	Отсканируйте штрихкод на этикетке пакета с пробирками BD OneFlow PCST (C) в поле Product ID (Идентификатор продукта) в разделе Experiment Layout (План эксперимента). Затем вручную введите точку с запятой (;) и шестизначный код пробирки, который указан рядом со штрихкодом на этикетке пробирки, после последней цифры штрихкода-
На рабочих листах отсутствуют точечные графики, или на точечных графиках отсутствуют гейты	Шаблон импортирован неправильно	1. Закройте текущий эксперимент. 2. Создайте новый эксперимент. 3. Повторно импортируйте шаблон OneFlow PCST
Некоторые ключевые слова отсутствуют в таблице статистики на рабочем листе анализа данных	Программное обеспечение BD FACSDiva не импортировало некоторые ключевые слова в шаблон панели	1. В окне Browser (Средство просмотра) установите указатель текущей пробирки на анализируемую пробирку. 2. Перейдите на рабочий лист анализа данных. 3. Щелкните таблицу статистики правой клавишей мыши и выберите Edit Stats View (Редактировать отображение статистики). 4. На вкладке Header (Заголовок) установите флажок All (Все). 5. Нажмите OK.
Заявление For in vitro diagnostic use (Для использования в диагностике in vitro) отсутствует в нижнем колонтитуле распечатанного рабочего листа анализа данных	Изменены размеры полей листа при печати	1. В строке меню программного обеспечения BD FACSDiva выберите File > Page Setup (Файл > Параметры страницы). 2. Убедитесь, что все поля составляют 2,54 см или 1 дюйм в зависимости от стандартов по умолчанию. 3. Нажмите OK.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В СООТВЕТСТВИИ С НАСТОЯЩИМ ДОКУМЕНТОМ ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА РАСПРОСТРАНЯЮТСЯ НА ПРОДАННЫЕ ИЗДЕЛИЯ ТОЛЬКО С ЦЕЛЬЮ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И СОДЕРЖИМОГО, ЗАЯВЛЕННОГО НА ЭТИКЕТКЕ ИЛИ НА МАРКИРОВКЕ ИЗДЕЛИЯ В МОМЕНТ ДОСТАВКИ ЕГО ЗАКАЗЧИКУ. КОМПАНИЯ BD ОТКАЗЫВАЕТСЯ ОТ ВСЕХ ДРУГИХ ГАРАНТИЙ, ЯВНЫХ ИЛИ НЕЯВНЫХ, ВКЛЮЧАЯ ГАРАНТИИ ПРИГОДНОСТИ И СООТВЕТСТВИЯ ДЛЯ ЛЮБОЙ КОНКРЕТНОЙ ЦЕЛИ, А ТАКЖЕ ГАРАНТИИ НЕНАРУШЕНИЯ ПАТЕНТОВ. ИСКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ BD ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЗАМЕНОЙ ИЗДЕЛИЙ ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ПОКУПНОЙ ЦЕНЫ. КОМПАНИЯ BD НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА МАТЕРИАЛЬНЫЙ УЩЕРБ ИЛИ ЛЮБЫЕ СЛУЧАЙНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ, ВКЛЮЧАЯ ТРАВМЫ ИЛИ ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОТЕРИ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗДЕЛИЕМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26:1908-1975.
- 2 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26:1986-2010.
- 3 Ling NR, MacLennan ICM, Mason DY. B-cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Ceballos S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:302-335.
- 4 Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
- 5 Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. NK-cell antigens: section report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. Vol 2. New York, NY: Oxford University Press; 1995:1367-1372.
- 6 Martin D, Fauchet R, Müller C, et al. Expression of HLA-A and -B antigens on differentiating U-937 cells. *Tissue Antigens*. 1985;25:235-246.
- 7 Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and Comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-43.

- 8 Kubagawa H, Gathings WE, Levitt D, Kearney JF, Cooper MD. Immunoglobulin isotype expression of normal pre-B cells as determined by immunofluorescence. *J Clin Immunol*. 1982;2:264-269.
- 9 Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
- 10 Appendix C. Summary of antibody names, code numbers, and donor laboratories. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:988-993.
- 11 Horvathova M, Gaillard JP, Liautard J, et al. Identification of novel and specific antigens of human plasma cells by mAb. In: Schlossman S, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:713-714.
- 12 Wijdenes J, Clément C, Klein B, Dore J-M. CD138 (syndecan-1) Workshop Panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGK, et al, eds. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Garland Publishing, Inc; 1997:249-252.
- 13 Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
- 14 Stelzel GT, Marti G, Hurley A, McCoy PJ, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
- 15 Nicholson JKA, Green TA. Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping: effect of specimen age on results. *J Immunol Methods*. 1993;165:31-35.
- 16 Paxton H, Bendele T. Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann NY Acad Sci*. 1993;677:440-443.
- 17 Davis BH, Dasgupta A, Kussick S, Han JY, Estrellado A; on behalf of ICSH/ICCS working group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part II - preanalytical issues. *Cytometry Part B* 2013;84B:286-290.
- 18 Stetler-Stevenson M, Greig B, Yuan C. Flow cytometric specimen collection, processing, and reporting. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, eds. *Laboratory Hematology Practice*. First Edition. Hoboken, NJ; Wiley-Blackwell Inc.; 2012:105-114.
- 19 Stetler-Stevenson M, Ahmad E, Barnett D, et al. *Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H43-A2.
- 20 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
- 21 Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html>. Accessed March 12, 2019.

ИСТОРИЯ

Редакция	Дата	Внесенные изменения
23-16839-00	2/2016	Первый выпуск
23-16839-01	5/2020	Переработано для поддержки использования продукта на проточных цитометрах BD FACSLyric

BD OneFlow™ PCD

Набор на 10 анализов — номер по
каталогу 659913

IVD

CE

BD, логотип BD, FACSCanto, FACSDiva, FACSLytic, FACSuite, Horizon, OneFlow и Vacutainer являются товарными знаками компании Becton, Dickinson and Company или ее аффилированных компаний. Все остальные товарные знаки принадлежат соответствующим владельцам. © BD, 2020. Все права защищены.



5/2020

23-16874-01



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA

Australian and New Zealand
Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Rd
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Ltd.
14b George Bourke Drive
Mt Wellington, Auckland, 1060
New Zealand

EC REP

Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.53.720.600
help.biosciences@bd.com

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ	5
3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ	6
4. РЕАГЕНТ	6
Состав реагента	6
Меры предосторожности	8
Хранение и обращение	9
5. ПРИБОРЫ	9
6. ОБРАЗЦЫ	10
7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ	11
Предоставляемые реагенты	11
Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы	12
8. ПРОЦЕДУРА	14
Установка анализа или шаблона OneFlow PCD	14
Настройка цитометра	16
Подготовка образца	17
Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLytic)	21
Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)	23
Сбор данных окрашенного образца	26
Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical	30

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva.....	32
9. ОГРАНИЧЕНИЯ.....	35
10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	35
Проточный цитометр BD FACSLytic	35
Проточный цитометр BD FACSCanto II.....	42
11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ	47
ГАРАНТИЯ.....	50
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	51
ИСТОРИЯ	53

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Пробирка BD OneFlow™ PCD (Plasma Cell Disorders — болезни плазматических клеток) при параллельном тестировании с пробиркой BD OneFlow™ PCST (Plasma Cell Screening Tube — пробирка для скрининга плазматических клеток) предназначена для проточно-цитометрического иммунофенотипирования нормальных и аномальных плазматических клеток в костном мозге в качестве вспомогательного средства при диагностике множественной миеломы и других болезней плазматических клеток. Пробирка BD OneFlow PCD предназначена для использования с соответствующим образом оснащенным проточным цитометром компании BD и программным обеспечением для диагностики *in vitro*.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Болезни плазматических клеток — это группа заболеваний, которые, как правило, характеризуются наличием клональной (опухолевой) популяции плазматических клеток в костном мозге¹. Эти клетки могут секретировать клональный иммуноглобулин, обнаруживаемый в крови. К данной группе заболеваний относятся, в частности, такие болезни как множественная миелома и моноклональная гаммапатия неясного генеза.

Консорциум EuroFlow™* разработал многоцветные панели антител для полного описания клеточных популяций в образце пациента при помощи иммунофенотипических маркеров, характерных для нормальных и аномальных клеток¹. В дополнение к оптимизированным многоцветным панелям антител протокол EuroFlow содержит стандартизованные процедуры настройки цитометра, определения настроек анализа, подготовки и окрашивания образца, сбора и анализа данных².

* Товарный знак и логотип EuroFlow и панели антител EuroFlow™ являются собственностью консорциума EuroFlow и не могут быть воспроизведены или опубликованы без предварительного письменного разрешения координатора EuroFlow (www.euroflow.org).

В соответствии с диагностическим протоколом EuroFlow каждая пробирка содержит набор опорных маркеров и набор классификационных маркеров¹. Опорные маркеры, общие для определенного набора панелей, используются для нормализации образцов, чтобы файлы данных можно было объединять и анализировать как один большой файл данных. Это маркеры, идентифицирующие отдельные клеточные популяции в конкретной клеточной линии. Классификационные маркеры выбраны за диагностическую способность различать типы клеток в заданной клеточной линии.

3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ

Многopараметрическая проточная цитометрия — чувствительный и быстрый инструмент для качественного и количественного описания клеточных популяций в образце. Клетки инкубируются с конъюгированными с флуорохромом антителами, которые связываются со своими целевыми молекулами. Окрашенные клетки затем можно анализировать как одиночные. Многopараметрический анализ данных используется для идентификации клеточных популяций в образце пациента и может привести к идентификации аномальной клональной клеточной популяции.

Количество параметров, используемых при проточно-цитометрическом иммунофенотипировании гематологических заболеваний, в последние годы возросло. Пробирка BD OneFlow PCD содержит панель конъюгированных с флуорохромом антител, которые идентифицируют нормальные и аномальные популяции плазматических клеток. Анализ точечных графиков позволяет идентифицировать нормальные и аномальные клеточные популяции.

4. РЕАГЕНТ

Состав реагента

BD OneFlow PCD состоит из одноразовых пробирок, содержащих следующие конъюгированные с флуорохромом антитела в оптимизированной высушенной форме. См. табл. 1

Табл. 1. Панель антител BD OneFlow PCD

Антитело	Флуорохром	Клон	Изотип
CD38	FITC	HB7 ³	IgG ₁ , κ
CD28	PE	L293 ⁴	IgG ₁ , κ
CD27	PerCP-Cy TM 5.5 ^a	L128 ⁵	IgG ₁ , κ
CD19	PE-Cy TM 7 ^a	SJ25-C1 ^{3,6}	IgG ₁ , κ
CD117	APC	104D2 ⁷	IgG ₁ , κ
CD81	APC-H7	JS81 ⁸	IgG ₁ , κ
CD45	V450 ^b	2D1 (анти-HLe-1) ^{9,10}	IgG ₁ , κ
CD138	V500-C ^b	MI15 ^{11,12}	IgG ₁ , κ

а. CyTM является товарным знаком компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Карнеги — Меллон (Carnegie Mellon University), изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других способов применения. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта и вы не можете ее получить, верните этот продукт нераспакованным в компанию BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

б. BD HorizonTM V450, BD HorizonTM V500-C

Антитела в пробирке BD OneFlow PCD были выбраны за свою способность идентифицировать плазматические клетки.

CD38, CD138, CD45 и CD19 — опорные маркеры для идентификации плазматических клеток.

CD27, CD28, CD117 и CD81 — классификационные маркеры для идентификации аномальных популяций плазматических клеток.

Полное описание возможностей антител, выбранных для пробирки BD OneFlow PCD, см. в статье с описанием панелей антител EuroFlow¹.

Меры предосторожности

- Реагент содержит от 0,25 до < 1 % 5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-она и 2-метил-4-изотиазолин-3-она (3 : 1) (номер CAS 2682-20-4) и от 0,1 до < 0,25 % азида натрия (номер CAS 26628-22-8).

В Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ (СГС) этот реагент классифицирован как опасный. Перейдите на regdocs.bd.com для загрузки паспорта безопасности вещества.

	Предупреждение
	H317: Может вызывать аллергическую кожную реакцию. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.
Предотвращение	P261: Избегать вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / вещества в распыленном состоянии. P272: Не выносить загрязненную одежду с места работы. P280: Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз/лица. P273: Не допускать попадания в окружающую среду.
Ответные меры	P302 + P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды. P333 + P313: При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу. P321: Применение специальных мер (см. паспорт безопасности материала). P363: Постирать загрязненную одежду перед последующим использованием.
Утилизация	P501: Утилизировать содержимое/контейнер на подходящем объекте по обработке и утилизации отходов в соответствии с применимыми законами, постановлениями и характеристиками продукта на момент утилизации.

Хранение и обращение

Храните пробирки при температуре 2–27 °C в пакетах из фольги. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. При соблюдении надлежащих условий хранения высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны до истечения срока годности, указанного на пакете и этикетках пробирок. Не используйте реагент после истечения срока хранения. При соблюдении надлежащих условий хранения высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны в течение одного месяца после вскрытия пакета.

ВНИМАНИЕ! Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

5. ПРИБОРЫ

BD OneFlow PCD предназначен для использования на следующих инструментах BD.

Табл. 2. Рекомендованные инструменты BD

Проточный цитометр	Настроечные гранулы	Настроечное программное обеспечение	Аналитическое программное обеспечение
BD FACSLytic™	Гранулы BD® CS&T Beads Семичетный комплект гранул BD® FC Beads 7-Color Kit Пятицветный комплект гранул BD® FC Beads 5-Color Kit	Программное обеспечение BD FACSuite™ Clinical версии 1.4 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии

Табл. 2. Рекомендованные инструменты BD

Проточный цитометр	Настроечные гранулы	Настроечное программное обеспечение	Аналитическое программное обеспечение
BD FACSCanto™ Ц ^b	Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads Настроечные гранулы BD OneFlow™ Setup Beads Восьмицветный комплект гранул BD® FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow™	Программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии

- а. 8-цветная конфигурация (4 синих, 2 красных, 2 фиолетовых), 10-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) или 12-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 5 фиолетовых)
 б. 3-лазерная, 8-цветная оптическая конфигурация BD 4-2H-2V по умолчанию (4-2H-2V)

6. ОБРАЗЦЫ

Пробирку BD OneFlow PCD можно использовать для проточно-цитометрического иммунофенотипирования аспиратов костного мозга, собранных в пробирки с ЭДТА или гепарином^{13–19} (например, в пробирки для сбора крови BD Vacutainer® blood collection tubes). Храните образцы перед окрашиванием при температуре 15–27 °С. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{13,14,17}.

Образцы необходимо обрабатывать сразу после сбора или в течение до 24 часов после сбора в случае хранения при комнатной температуре^{15,16,18,19}. Если обработка проводится не сразу после сбора, лаборатория должна подтвердить, что образцы, которые обрабатываются и хранятся в соответствии с процедурами данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, обработанных сразу после сбора.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендованное предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток¹³.

Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °C в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{14,15} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Предоставляемые реагенты

Реагент BD OneFlow PCD предоставляется в виде одноразовых пробирок в пакетах из фольги. В каждом наборе содержится два пакета, в каждом из которых по пять пробирок BD OneFlow PCD.

Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- BD OneFlow™ Assays Installer I (Инсталлятор I для анализов BD OneFlow™) (номер по каталогу 664225)

Для анализа OneFlow PCD необходимо использовать инсталлятор. Анализ содержит лист сбора данных, лабораторный отчет, отчет лечащего врача и дополнительный отчет, который используется для дальнейшего обследования. Если у вас еще нет текущей версии анализа OneFlow PCD, инсталлятор для анализов BD OneFlow необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow PCD. Инсталлятор также содержит анализы для других реагентов BD OneFlow™.

Руководство по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™ предоставляется вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Инсталлятор шаблонов для анализов BD OneFlow™ (номер по каталогу 659305)

Для шаблона OneFlow PCD необходимо использовать инсталлятор. Шаблон содержит два общих рабочих листа: рабочий лист OneFlow PCD Acquisition и рабочий лист OneFlow PCD Analysis. Если у вас еще нет текущей версии шаблона OneFlow PCD, инсталлятор необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow PCD. Инсталлятор также содержит шаблон OneFlow Setup и шаблоны для других реагентов BD OneFlow.

Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™ и Руководство по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток поставляются вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

- Конические полипропиленовые пробирки объемом 15 мл.
- Пастеровская пипетка.
- Серологическая пипетка.
- Микропипетка с наконечниками.
- Мешалка «вортекс».
- Центрифуга.
- Промывочный буфер (фильтрованный PBS + 0,5 % BSA + 0,09 % или 0,1 % азида натрия).
- Набор для фиксации и пермеабиллизации клеток FIX & PERM®.

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- Гранулы BD CS&T Beads (номер по каталогу 656504 или 656505).
- Семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit (№ по каталогу 656867).
- Пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit (№ по каталогу 661564).

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads (номер по каталогу 656046 или 656047).
- Настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads (номер по каталогу 658620).
- Восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow (номер по каталогу 658621).

8. ПРОЦЕДУРА

Установка анализа или шаблона OneFlow PCD

Анализ OneFlow PCD, используемый с программным обеспечением BD FACSuite Clinical, или шаблон OneFlow PCD, используемый с программным обеспечением BD FACSDiva, необходимо установить до первого запуска анализа. Одновременно с этим при необходимости можно установить дополнительные анализы или шаблоны. Если анализ файлов FCS осуществляется на отличной от использовавшейся для сбора данных образцов рабочей станции, анализы или шаблоны необходимо установить на обе рабочие станции.

Для установки анализа OneFlow в программном обеспечении BD FACSuite Clinical необходимо выполнить следующие действия.

1. Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.
Откроется мастер установки анализов BD OneFlow InstallShield.
2. Щелкните **Next** (Далее).
Откроется лицензионное соглашение.
3. Выберите вариант **I accept the terms in the license agreement** (Я принимаю условия лицензионного соглашения) и нажмите **Next** (Далее).
4. Чтобы установить все анализы, имеющиеся на инсталляторе, выберите опцию **Complete** (Полная установка) и нажмите **Next** (Далее).
5. Необязательно: Чтобы установить анализы, имеющиеся на инсталляторе, выборочно, укажите вариант **Custom** (Пользовательская установка) и нажмите **Next** (Далее).

Откроется диалоговое окно **Custom Setup** (Пользовательская настройка).

- Нажмите на меню слева от соответствующего анализа.

- В меню выберите **This assay will be installed on your local hard drive** (Этот анализ будет установлен на жесткий диск).

6. Нажмите **Install** (Установить).

Анализы будут установлены в Library (Библиотека).

7. Выберите **Finish** (Готово).

Мастер установки анализов InstallShield закроется.

8. Необязательно: дважды щелкните ознакомительный файл (ReadMe), расположенный на инсталляторе.

Откроется ознакомительный файл (ReadMe).

9. Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.

10. Извлеките инсталлятор.

Для установки шаблона OneFlow в программном обеспечении BD FACSDiva необходимо выполнить следующие действия.

ПРИМЕЧАНИЕ При выборе шаблона для установки он записывается поверх шаблона с таким же именем, если таковой был установлен в системе. Если вы не хотите, чтобы имеющийся на вашем компьютере шаблон был перезаписан, не выбирайте этот шаблон в установщике в процессе установки.

1. Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.

2. Следуйте инструкциям в диалоговом окне.

Инсталлятор скопирует и вставит шаблоны в папку
D:\BDEExport\Templates\Panel\BD Panels.

ПРИМЕЧАНИЕ Если в вашей системе всего один жесткий диск, шаблоны будут установлены в папку
C:\BDEExport\Templates\Panel\BD Panels.

По завершении установки откроется диалоговое окно с сообщением, какие шаблоны успешно скопированы в папку.

3. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть диалоговое окно.
4. Откроется ознакомительный файл инсталлятора (ReadMe). Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.
5. Извлеките инсталлятор.

Настройка цитометра

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

1. Для осуществления контроля качества определения характеристик (CQC) каждые 6 месяцев или по необходимости, ежедневного контроля качества работы (PQC), ежедневной настройки анализов и параметров пробирок используйте гранулы BD CS&T Beads и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.
2. Для обновления эталонных настроек каждые 60 дней используйте семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.

Обратитесь к *Инструкциям по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™* и *BD FACSLytic™ Clinical Reference System* (Справочная клиническая система BD FACSLytic™), а также документации по соответствующему реагенту для получения дополнительной информации.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads (CS&T IVD Beads) и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для установки базового уровня цитометра и проведения ежедневных проверок работоспособности.

2. Используйте настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, лизированную промытую кровь и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной настройки напряжений фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) и детекторов светорассеяния.
3. Используйте гранулы BD FC Beads и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной установки компенсации флуоресценции.
4. Рекомендуется убедиться, что напряжения ФЭУ (PMTV) находятся в ежедневных целевых диапазонах.

Подробную информацию см. в *Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™* и документации по соответствующему реагенту.

Подготовка образца

Промывка образца

ПРИМЕЧАНИЕ Перед промывкой образца убедитесь, что цитометр правильно настроен.

1. Нанесите идентификатор образца на коническую пробирку объемом 15 мл.
2. Десять раз переверните пробирку с образцом, чтобы как следует перемешать ее содержимое.
3. Добавьте в помеченную коническую пробирку 300 мкл образца.
4. Добавьте 10 мл промывочного буфера (фильтрованный PBS + 0,5 % BSA + 0,1 % азида натрия).
5. Переверните пробирку 3–5 раз, чтобы как следует перемешать ее содержимое.
6. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.

-
7. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок.
 8. Перед добавлением промывочного буфера встряхните пробирку на «вортексе», чтобы не осталось клеточных агрегатов.
 9. Повторите шаги 4–8 еще два раза — итого три промывки.
 10. Ресуспендируйте клеточный осадок в 200 мкл промывочного буфера до конечного объема приблизительно 300 мкл.
 11. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы полностью ресуспендировать клеточный осадок.

ПРИМЕЧАНИЕ Приступите к окрашиванию образца при помощи пробирки BD OneFlow PCD в течение 30 минут после последней промывки. До окрашивания храните промытый образец при 20–25 °C.

Окрашивание образца

12. Если пакет хранился в холодильнике, не открывайте пакет, пока он не нагреется до комнатной температуры.

ПРИМЕЧАНИЕ Реагент очень чувствителен к влаге. Во избежание образования конденсата открывайте пакет, только если его температура равна комнатной.

13. Для каждого образца пациента извлеките пробирку BD OneFlow PCD из пакета и немедленно закройте пакет.
14. Поместите пробирки в штатив, защищенный от света.

Приступите к окрашиванию образца в течение часа после изъятия пробирки из пакета.

15. Немедленно закройте пакет с неиспользованными пробирками.

ПРИМЕЧАНИЕ Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

-
16. Напишите идентификатор пациента в соответствующем месте на этикетке пробирки BD OneFlow PCD.

ПРИМЕЧАНИЕ Вскрыв пакет, напишите на этикетке пакета текущую дату. Используйте все пробирки из пакета в течение месяца, прежде чем вскрывать новый.

17. Встряхните промытый образец на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать.
18. Добавьте в пробирку 50 мкл промывочного буфера и 50 мкл промытого образца. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
19. Инкубируйте в течение 30 минут при 20–25 °C в темноте.
20. Добавьте 1,5 мл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
21. Добавьте еще 1,5 мл промывочного буфера. Аккуратно встряхните на «вортексе», чтобы перемешать содержимое.
22. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
23. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
24. Энергично встряхните на «вортексе» до полного ресуспендирования клеточного осадка.
25. Добавьте в пробирку 100 мкл фиксирующего раствора FIX & PERM Reagent A. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.

ПРИМЕЧАНИЕ Пробирка BD OneFlow PCD не окрашивает внутриклеточные маркеры. Однако этапы фиксации и пермеабелизации очень важны для прямого сравнения результатов окрашивания с результатами использования пробирок BD OneFlow PCST.

-
26. Инкубируйте в течение 15 минут при 20–25 °С в темноте.
 27. Добавьте 1,5 мл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
 28. Добавьте еще 1,5 мл промывочного буфера. Аккуратно встряхните на «вортексе», чтобы перемешать содержимое.
 29. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °С.
 30. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
 31. Энергично встряхните на «вортексе» до полного ресуспендирования клеточного осадка.

ПРИМЕЧАНИЕ Если получить суспензию отдельных клеток не удастся, ознакомьтесь с разделом «Поиск и устранение неисправностей».

32. Измерьте объем в каждой пробирке при помощи пипетки и добавьте промывочный буфер до конечного объема 100 мкл в каждой пробирке. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.

ПРИМЕЧАНИЕ Очень важно обеспечить конечный объем 100 мкл в каждой пробирке, чтобы все клетки были полностью пермеабиллизированы во время этапов 19–21.

33. Добавьте 100 мкл пермеабиллизующего раствора FIX & PERM Reagent B в пробирку.
34. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
35. Инкубируйте в течение 15 минут при 20–25 °С в темноте.

36. Добавьте 1,5 мл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
37. Добавьте еще 1,5 мл промывочного буфера. Аккуратно встряхните на «вортексе», чтобы перемешать содержимое.
38. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
39. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
40. Добавьте в пробирку 200 мкл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы полностью ресуспендировать клеточный осадок.

ПРИМЕЧАНИЕ Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °C в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLyric)

Добавьте идентификатор партии реагента и срок годности в библиотеку следующим образом.

1. На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок Library (Библиотека).
Откроется рабочая область Library (Библиотека).
2. Откройте меню **Beads and Reagents** (Гранулы и реагенты) и выберите **Reagents** (Реагенты).

-
3. В списке **Product Name** (Наименование изделия) выберите OneFlow PCD.

В нижней части страницы появится панель **OneFlow PCD**.

4. Щелкните **Add Lot** (Добавить партию).

Откроется диалоговое окно **Add New Lot** (Добавить новую партию).

5. Вручную введите **Lot ID** (Идентификатор партии), указанный на этикетке пробирки.
6. Нажмите на значок календаря и выберите на календаре дату истечения срока годности, указанную на этикетке пробирки.
7. Установите флажок **Current Lot** (Текущая партия).
8. Нажмите **OK**.

Идентификатор партии и срок годности будут добавлены в соответствующие поля сведений о реагенте.

ПРИМЕЧАНИЕ Убедитесь, что идентификатор партии реагента и срок годности добавлены в сведения о реагенте до начала сбора данных образцов. Эту процедуру необходимо выполнить только один раз для одной партии реагентов.

Порядок создания рабочей процедуры:

1. На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок Worklists (Рабочие процедуры).

Откроется рабочая область Worklists (Рабочие процедуры).

2. На вкладке **Manage Worklists** (Управление рабочими процедурами) нажмите кнопку **New** (Новая).

В новой вкладке откроется пустая рабочая процедура.

3. В разделе **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры) выберите в меню **Task** (Задача) нужную задачу.

4. Для задач, связанных с реагентами OneFlow, введите **Sample ID** (Идентификатор образца) вручную.

Не сканируйте штрихкод на этикетке пробирки в программное обеспечение.

ПРИМЕЧАНИЕ Разные партии одного реагента нельзя использовать в рамках одной рабочей процедуры.

5. В разделе **Loading Options** (Параметры загрузки) выберите **Manual** (Вручную) в меню **Loading Option** (Параметры загрузки).

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)

1. В строке меню выберите **Edit > User Preferences** (Редактировать > Настройки пользователя), перейдите на вкладку **FCS** и выберите **Export FCS after recording** (Экспорт FCS после записи) для автоматического экспорта файлов FCS после сбора данных. Нажмите **OK**.
2. Убедитесь, что выбрана конфигурация цитометра BD по умолчанию 4-2H-2V.
3. В строке меню выберите **Experiment > New Experiment > Blank Experiment** (Эксперимент > Новый эксперимент > Пустой эксперимент). Нажмите **OK**.

ПРИМЕЧАНИЕ Также эксперимент можно создать непосредственно из окна **Browser** (Средство просмотра), щелкнув значок **Experiment** (Эксперимент).

4. Если отображается диалоговое окно **CST Mismatch** (Несовпадение CST), выберите **Use CST Settings** (Использовать параметры CST).
5. Переименуйте эксперимент в соответствии с правилами лаборатории.

-
6. В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Link Setup** (Настройки цитометра > Привязать настройки) и выберите соответствующую матрицу компенсации, рассчитанную с использованием гранул BD FC Beads в течение последних 31 суток. Щелкните **Link** (Привязать). См. инструкцию по эксплуатации восьмицветного комплекта гранул *BD® FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow™* или *Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™*.
 7. Если отображается диалоговое окно **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), выберите **Overwrite** (Перезаписать).
 8. Щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Unlink From** (Настройки цитометра > Отменить связь с) и выберите ранее привязанную настройку компенсации. Нажмите **OK**.

ПРИМЕЧАНИЕ Отмена связи с настройкой компенсации позволяет применить обновленные параметры приложения, сохранив значения компенсации.

9. В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Application Settings > Apply** (Настройки цитометра > Параметры приложения > Применить) и выберите самые последние параметры приложения, определенные за последние 31 сутки с использованием настроечных гранул BD OneFlow Setup Beads. Щелкните **Apply** (Применить).
10. Откроется диалоговое окно **Confirm** (Подтвердить). Выберите **Keep the compensation value** (Сохранить значение компенсации).
11. При появлении диалогового окна **Confirm Cytometer Changes** (Подтвердить изменения настроек цитометра) щелкните **Yes** (Да), чтобы перезаписать значения настроек цитометра для **FSC Area Scaling** (Масштабирование области FSC).

-
12. В строке меню выберите **Experiment > New Specimen** (Эксперимент > Новый образец).

Откроется диалоговое окно **Panel Templates** (Шаблоны панели).

13. Перейдите на вкладку **BD Panels** (Панели BD) и выберите шаблон **OneFlow PCD**.

ПРИМЕЧАНИЕ Необходимо выбрать шаблон той пробирки, сбор данных которой производится.

14. Укажите количество образцов пациентов, для которых необходимо выполнить сбор данных, в поле **Copies** (Копии) внизу вкладки **BD Panels** (Панели BD). Нажмите **OK**.

15. Переименуйте образцы, например укажите соответствующие идентификаторы пациента перед названиями образцов.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости повторить запуск конкретного образца пациента установите указатель текущей пробирки на пробирку, запуск которой нужно повторить. Нажмите кнопку **Next Tube** (Следующая пробирка) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы создать еще одну пробирку для этого пациента. Не используйте для создания дополнительной пробирки пункт меню **Experiment > New Tube** (Эксперимент > Новая пробирка) или значок **New Tube** (Новая пробирка) в строке меню **Browser** (Средство просмотра), поскольку в таком случае поля этикеток и штрихкода заполнены не будут.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости выполнить сбор данных для других образцов пациентов в данном эксперименте повторите шаги 12–15, чтобы добавить новые образцы. Откроются два диалоговых окна **Confirm** (Подтвердить) с вопросами, хотите ли вы создать еще один рабочий лист сбора данных PCD или рабочий лист анализа данных PCD. Нажмите **Cancel** (Отмена) в каждом диалоговом окне.

-
16. В строке меню выберите **Experiment > Experiment Layout** (Эксперимент > План эксперимента) и перейдите на вкладку **Keywords** (Ключевые слова).
 17. Выделите ключевое слово **Product ID** (Идентификатор продукта) для соответствующей пробирки и отсканируйте штрихкод на пробирке BD OneFlow PCD.

ПРИМЕЧАНИЕ Если отсканировать штрихкод на этикетке пробирки не удастся, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

18. Вручную добавьте необходимую информацию в оставшиеся ключевые слова.
19. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть **Experiment Layout** (План эксперимента).

Сбор данных окрашенного образца

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

Анализ автоматически соберет 100 000 событий. После начала сбора данных невозможно изменить количество событий. Поэтому, если необходимо изменить количество событий, сделайте это до начала сбора данных. Инструкции по изменению количества событий для сбора см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

Чтобы собрать данные образца, выполните следующие действия.

1. Нажмите **Run All** (Выполнить все) в меню **Run** (Выполнить) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы выполнить рабочую процедуру с самого начала.

Либо, чтобы собрать данные для конкретной пробирки, наведите указатель выполнения на образец, для которого необходимо выполнить сбор, и нажмите **Run from Pointer** (Выполнить, начиная с положения указателя) в меню **Run** (Выполнить).

2. Встряхните каждую окрашенную пробирку на «вортексе» в течение 3–5 секунд на низкой скорости непосредственно перед сбором данных пробирки.
3. Следуйте подсказкам в программном обеспечении, чтобы загрузить или извлечь пробирки.

Откроется рабочий лист сбора данных OneFlow PCD Acquisition. Рабочий лист сбора данных содержит точечные графики и гейты, позволяющие идентифицировать клетки, клетки CD38⁺ и В-клетки.

4. Исследуйте каждый точечный график на рабочем листе сбора данных.

ПРИМЕЧАНИЕ Время предварительного просмотра составляет 10 секунд, затем данные записываются автоматически. Не увеличивайте время предварительного просмотра и не используйте недостаточный объем образца во избежание риска его потери.

5. Если предполагается собрать менее 100 000 событий, отслеживайте объем образца и нажмите **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор данных до опустошения пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Анализ автоматически соберет 100 000 событий. Если это невозможно, сбор прекращается по истечении 5 минут. Однако необходимо отслеживать объем образцов и нажать **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор до опустошения пробирки. Инструкции по изменению критериев остановки см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLyric™*.

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. Встряхните клетки на «вортексе» в течение 3–5 секунд на низкой скорости непосредственно перед сбором данных пробирки на проточном цитометре.
2. В окне **Browser** (Средство просмотра) разверните соответствующий образец и установите указатель текущей пробирки на нужную.
3. Установите пробирку в цитометр. Установите скорость потока на **Medium** (Средняя) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных). Щелкните **Acquire Data** (Сбор данных).
4. Убедитесь, что популяция охвачена шкалой, и отрегулируйте гейт на первом точечном графике рабочего листа **BD OneFlow PCD Acquisition**, чтобы исключить примеси, если необходимо.
5. Щелкните **Record Data** (Регистрировать данные) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы собрать нужное количество событий.

ПРИМЕЧАНИЕ Шаблон автоматически соберет 100 000 событий. При необходимости используйте меню в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы выбрать другое количество событий для сбора. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

6. Изучите точечные графики на рабочем листе сбора данных PCD и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Для идентификации клеток используется точечный график FSC-A против SSC-A.

Точечный график CD38 FITC-A против CD45 V450-A используется для идентификации клеток CD38⁺.

Точечный график CD19 PE-Cy7-A против SSC-A используется для идентификации В-клеток.

Точечные графики для оставшихся маркеров гейтов не содержат и включены в качестве гарантии окрашивания антителами клеток образца, то есть внутреннего контроля качества окрашивания пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток на рабочем листе сбора данных PCD см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток*.

7. Соберите данные следующего образца.
8. В строке меню выберите **File > Export > Experiments** (Файл > Экспортировать > Эксперименты) и выберите параметр **Directory Export** (Экспортировать каталог). Нажмите **OK**.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical

1. Наведите указатель выполнения на соответствующий образец на панели **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры).

OneFlow PCD Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow PCD) откроется во вкладке **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).

2. Ознакомьтесь с OneFlow PCD Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow PCD).

На первой странице лабораторного отчета представлена информация об образце и пробирке, статистика популяции и сообщения КК, при наличии.

ПРИМЕЧАНИЕ Для популяций с недостаточным числом событий строки %Parent (%Исходная) или %Grandparent (%Исходная исходной) могут отображаться со значением 0,0 %. Это происходит из-за округления результата до одного знака после запятой в программном обеспечении BD FACSuite Clinical.

3. Изучите точечные графики на 2-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 2-й странице лабораторного отчета представляют клеточный анализ высокого уровня, идентифицируя клетки, одиночные события FSC, одиночные события SSC, клетки CD38⁺, плазматические клетки и В -клетки.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

-
4. Изучите точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета используются для анализа плазматических клеток в образце. Представлены точечные графики и гейты, позволяющие идентифицировать клетки CD38⁺ и плазматические клетки. Оставшиеся точечные графики характеризуют плазматические клетки в образце.

5. Изучите 4-ю страницу лабораторного отчета.

На 4-й странице лабораторного отчета представлена информация о номере партии и сроке годности гранул BD CS&T Beads и реагента BD OneFlow, настройках контрольных значений, настройках пробирок и конфигурации цитометра.

6. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Physician Report** (Отчет для лечащего врача), чтобы просмотреть отчет.

OneFlow PCD Physician Report (Отчет OneFlow PCD для лечащего врача) содержит общую сводку результатов анализа.

7. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Supplemental Report** (Дополнительный отчет), чтобы включить дополнительные точечные графики для дальнейшего анализа образца.

Дополнительную информацию см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые области с гейтами, удаленные в этом дополнительном отчете, отражаются в лабораторном отчете и отчете для лечащего врача. Любые области с гейтами, созданные в этом дополнительном отчете, должны быть отражены в лабораторном отчете.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Не добавляйте точечные графики и гейты в лабораторный отчет или отчет для лечащего врача. Их невозможно удалить, и они сделают отчет недействительным.

8. Перейдите на вкладку **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).
9. Щелкните **Approved** (Утверждено).

Откроется диалоговое окно **ESignature** (Электронная подпись).

10. Выберите идентификационный номер пользователя.
11. Введите пароль.
12. Дополнительно: введите комментарии.
13. Щелкните **Sign** (Подписать).

В поле E-signature (Электронная подпись) всех трех отчетов добавляются идентификационный номер пользователя, подписавшего отчеты, дата и время подписания, а также комментарии.

Дополнительные сведения и информацию о вариантах экспорта см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva

1. В строке меню выберите **File > Import > Experiments** (Файл > Импортировать > Эксперименты).
2. Выберите эксперимент, который нужно проанализировать. Щелкните **Import** (Импортировать).

Откроется эксперимент с соответствующими рабочими листами сбора и анализа данных.

3. Выберите вкладку рабочего листа **BD OneFlow PCD Analysis**.

-
4. Изучите графики на 1-й странице рабочего листа анализа данных PCD и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Первые три точечных графика на 1-й странице рабочего листа анализа данных идентифицируют одиночные события по FSC и SSC. Клеточные обломки и слипшиеся клетки исключаются регулировкой гейтов.

Клетки CD38⁺ идентифицируются на точечном графике CD38 FITC-A против CD45 V450-A, а затем плазматические клетки идентифицируются на точечном графике CD38 FITC-A против CD138 V500-A. Эти два точечных графика также приведены для справки наверху 2-й страницы рабочего листа анализа данных PCD. Точечный график CD38 FITC-A против SSC-A приведен для сведения в целях визуализации клеток CD38^{арк}.

B-клетки идентифицируются на точечном графике CD19 PE-Cy7-A против SSC-A.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток*.

-
- Изучите точечные графики на 2-й странице рабочего листа анализа данных PCD.

На точечных графиках на 2-й странице рабочего листа анализа данных PCD присутствуют маркеры, которые могут помочь характеризовать плазматические клетки как нормальные или аномальные.

- Изучите результаты в таблице статистики на стр. 3 рабочего листа анализа данных PCD.

Убедитесь, что в таблице статистики присутствуют все ключевые слова. Если какие-либо ключевые слова отсутствуют, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

- Выполните дальнейшие анализы по мере необходимости.

ПРИМЕЧАНИЕ На точечных графиках рабочего листа анализа данных PCD представлены гейты для нормальных клеточных популяций. Если анализ выявил клеточные популяции за пределами предложенных гейтов, они могут оказаться аномальными и потребовать дальнейшего анализа.

- Сохраните рабочий лист анализа данных PCD в формате PDF.

ПРИМЕЧАНИЕ Рабочий лист анализа данных PCD — это общий рабочий лист. При изменении гейтов в ходе анализа образца в общем рабочем листе таковые будут изменены в ранее проанализированных файлах. Сохраненные файлы PDF изменены не будут, но при возвращении к ранее проанализированному общему рабочему листу придется вернуть гейты на прежнее место.

- (Необязательно.) Щелкните **Print** (Печать), чтобы напечатать рабочий лист анализа данных PCD.
- Выполните анализ следующего образца.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Использование терапевтических моноклональных антител для лечения пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.
- Использование данного реагента для диагностической оценки нарушений со стороны кроветворной системы возможно лишь в контексте тщательного иммунофенотипического анализа, включающего другие релевантные маркеры.
- Для использования реагента BD OneFlow PCD необходимо обладать опытом иммунофенотипирования и классификации лейкоцитов и лимфом. Результаты должен интерпретировать патолог или аналогичный специалист с учетом других клинических и лабораторных данных.
- Эффективность реагента BD OneFlow PCD при тестировании образцов пациентов с минимальной остаточной болезнью (МОБ) не установлена.
- Не используйте образцы сомнительного качества, в том числе свернувшиеся, гемолизированные, замороженные и охлажденные образцы.
- Испытания работы BD OneFlow PCD с универсальным загрузчиком BD FACSTM Universal Loader не проводились.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Проточный цитометр BD FACSLytic

Исследования прецизионности для воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow PCD были выполнены в исследовательском центре BD Research Centre в Ирландии.

Воспроизводимость и повторяемость (проточный цитометр BD FACSLytic)

В одном центре проведено 5-дневное исследование воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow PCD с использованием контрольного материала. Использовались три источника контрольного материала: контрольные образцы BD® Multi-Check Control, CD-Chex CD117® Plus и CD-Chex CD103 Plus®, чтобы оценить все маркеры, распознаваемые антителами в реагенте BD OneFlow PCD. Оценка прецизионности проводилась между тремя проточными цитометрами BD FACSLytic тремя операторами, которые собирали данные контрольных материалов. Каждый оператор окрашивал два контрольных образца с использованием трех партий BD OneFlow PCD. Каждый оператор выполнял по два независимых тестирования в каждый из 5 дней оценки.

Было определено процентное содержание восьми клеточных популяций, приведенных в следующих таблицах. В таблицах показано среднее значение, среднееквадратичное отклонение (SD), %CV (коэффициент вариации) и верхний 95%-й доверительный предел (CL) воспроизводимости (воспроизводимости между операторами / между приборами и операторами / между приборами, между партиями, между тестированиями, между днями) и повторяемости (прецизионности в пределах тестирования) для каждого процентного содержания субпопуляций.

Табл. 3. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
В -клетки (% одиночных событий SSC)	3,66	0,14	0,16	3,87	4,35
CD117 (% одиночных событий SSC)	4,31	0,32	0,36	7,34	8,26

Табл. 3. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
CD81 (% В -клеток)	97,32	0,56	0,64	0,58	0,65
CD27 (% плазматических клеток)	98,60	0,16	0,18	0,16	0,18
CD28 (% плазматических клеток)	98,92	0,14	0,16	0,15	0,16
CD45 (% плазматических клеток)	98,54	0,26	0,29	0,26	0,29
CD38 (% одиночных событий SSC)	48,10	0,86	0,99	1,80	2,02
CD138 (% CD38 ⁺)	99,98	0,01	0,02	0,01	0,02

Табл. 4. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
В -клетки (% одиночных событий SSC)	3,66	0,38	0,43	10,36	11,65
CD117 (% одиночных событий SSC)	4,31	0,44	0,51	10,28	11,56
CD81 (% В -клеток)	97,32	0,66	0,76	0,68	0,76
CD27 (% плазматических клеток)	98,60	0,22	0,25	0,22	0,25
CD28 (% плазматических клеток)	98,92	0,16	0,18	0,16	0,18
CD45 (% плазматических клеток)	98,54	0,19	0,21	0,19	0,21
CD38 (% одиночных событий SSC)	48,10	0,57	0,66	1,19	1,34

Табл. 4. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
CD138 (% CD38 ⁺)	99,98	0,03	0,04	0,03	0,03

Сравнение методов (для проточных цитометров BD FACSLytic)

Было проведено сравнительное исследование использования системы BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLytic (исследуемый метод) и BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSCanto II (сравнительный метод) в 4 клинических центрах. Система BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLytic включает гранулы BD CS&T Beads, семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit и BD OneFlow PCD со сбором данных на десятицветном проточном цитометре BD FACSLytic (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) с использованием программного обеспечения BD FACSuite Clinical версии 1.3[†] и анализа OneFlow PCD. Эталонная система BD OneFlow на BD FACSCanto II включает гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads, настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow Assay и BD OneFlow PCD со сбором данных на проточном цитометре BD FACSCanto II (4-2H-2V) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva версии 8.0.2 и шаблона OneFlow PCD. Всего в исследовании использовалось 78 оцениваемых образцов костного мозга. Образцы были собраны с использованием указанных антикоагулянтов. См. табл. 5.

[†] Проведено исследование регрессии, продемонстрировавшее эквивалентность программного обеспечения BD FACSuite Clinical версий 1.3 и 1.4.

Табл. 5. Антикоагулянты, использованные для сбора образцов

Тип образца	Антикоагулянт	
	ЭДТА	Гепарин
Наличие аномальных плазматических клеток	41	1
Отсутствие аномальных плазматических клеток	33	3
Всего	74	4

Для всех образцов в исследовании первый этап промывки начался в течение 24 часов после сбора. Сбор данных всех окрашенных образцов выполнялся в течение 45 минут после окончательного ресуспензирования. Для всех образцов в исследовании количество событий плазматических клеток и процентное содержание находились в указанных пределах. См. табл. 6.

Табл. 6. Пределы событий и процентного содержания плазматических клеток

Плазматические клетки	Диапазон
Количество событий	19–38 065
% одиночных событий SSC	0–41,9 %

Все оцениваемые образцы были охарактеризованы как содержащие аномальные плазматические клетки («Наличие аномальных плазматических клеток») или не содержащие аномальных плазматических клеток («Отсутствие аномальных плазматических клеток») с использованием двух систем и сопоставлены.

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

Общий % согласованности = $((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100$

% положительной согласованности = $(a / (a + c)) \times 100$

% отрицательной согласованности = $(d / (d + b)) \times 100$

где

a = количество образцов, охарактеризованных как «Наличие аномальных плазматических клеток» согласно обеим системам;

b = количество образцов, охарактеризованных как «Наличие аномальных плазматических клеток» на проточном цитометре BD FACSLyric и «Отсутствие аномальных плазматических клеток» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

c = количество образцов, охарактеризованных как «Отсутствие аномальных плазматических клеток» на проточном цитометре BD FACSLyric и «Наличие аномальных плазматических клеток» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

d = количество образцов, охарактеризованных как «Отсутствие аномальных плазматических клеток» согласно обеим системам.

Результаты анализа образцов, идентифицированных как «Наличие аномальных плазматических клеток» или «Отсутствие аномальных плазматических клеток», были сведены в таблицу. См. табл. 7.

Табл. 7. Согласованность разделения образцов на группы «Наличие аномальных плазматических клеток» и «Отсутствие аномальных плазматических клеток»

		Сравнительный метод (проточный цитометр BD FACSCanto II)		
		Наличие аномальных плазматических клеток	Отсутствие аномальных плазматических клеток	
Исследуемый метод (BD FACSLyric)	Наличие аномальных плазматических клеток	42	0	42
	Отсутствие аномальных плазматических клеток	0	36	36
	Всего	42	36	78

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 96,23 %.

Положительная согласованность для «Наличия аномальных плазматических клеток» составляет 100 %. Отрицательная согласованность для «Отсутствия аномальных плазматических клеток» составляет 100 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSLyric)

Количественная оценка указанных клеточных популяций, выраженная как процент от указанной клеточной популяции, была выполнена для каждого оцениваемого образца, участвующего в исследовании сравнения методов. Был проведен анализ образцов с использованием системы BD OneFlow с проточным цитометром BD FACSLyric и с проточным цитометром BD FACSCanto II, как описано ранее.

Для всех оцениваемых образцов была рассчитана средняя систематическая ошибка для популяции плазматических клеток, выраженной как процент от одиночных событий SSC, определенных на проточном цитометре BD FACSLyric и проточном цитометре BD FACSCanto II. См. табл. 8.

Табл. 8. Обзор средней систематической ошибки для процентного содержания субпопуляций

Популяция	Количество образцов ^а	Средняя систематическая ошибка	Нижний 95%-й CL средней систематической ошибки	Верхний 95%-й CL средней систематической ошибки
Плазматические клетки (% одиночных событий SSC)	78	0,19	-0,1	0,48

а. Некоторые образцы, возможно, были исключены из-за того, что было собрано мало событий.

Результаты сравнения методов и исследований эквивалентности свидетельствуют, что эти две системы по существу эквивалентны.

Проточный цитометр BD FACSCanto II

Исследования воспроизводимости и повторяемости анализов с использованием BD OneFlow PCD были выполнены в лабораториях компании BD Biosciences в городе Сан-Хосе, штат Калифорния (США).

Воспроизводимость (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Два оператора выполняли по две независимые серии анализов в течение восьми дней на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II по очереди. Воспроизводимость CD38, CD28, CD27, CD19, CD117, CD81 и CD45 оценивалась с использованием контроля BD Multi-Check, дополненного контролем CD-Chex CD117 Plus. Воспроизводимость CD138 оценивалась с использованием костного мозга. Для каждой серии анализов каждым оператором было выполнено окрашивание двух контрольных образцов (контроля BD Multi-Check Control, дополненного контролем CD-Chex CD117 Plus, или костного мозга) с использованием трех партий BD OneFlow PCD, сбор данных с использованием рабочего листа BD OneFlow PCD Acquisition и анализ с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Было определено процентное содержание клеточных популяций, положительно окрашенных на CD38, CD28, CD27, CD19, CD117, CD81 и CD45, в исходной популяции (субпопуляция %P). Было определено процентное содержание клеток CD138⁺ в популяции плазматических клеток CD38^{ярк.} (субпопуляция %CD38^{ярк.}) в костном мозге. Общая воспроизводимость по показателю «Субпопуляция %P» была рассчитана для каждого антитела. Общая воспроизводимость включает четыре компонента: между оператором/прибором и оператором/прибором, между партиями, между анализами и между днями. См. табл. 9

Табл. 9. Воспроизводимость субпопуляции %P

Популяция	DF ^a	SD ^b	%CV ^c	UCL ^d
CD28 ⁺	95	0,53	0,71	0,80

Табл. 9. Воспроизводимость субпопуляции %P

Популяция	DF ^a	SD ^b	%CV ^c	UCL ^d
CD27 ⁺	95	0,72	1,0	1,12
CD19 ⁺	95	0,18	1,21	1,36
CD81 ⁺	95	1,46	1,53	1,71
CD117 ⁺	95	0,32	5,51	6,18
CD45 ⁺	95	0,50	0,52	0,59
CD38 ⁺	95	2,34	6,07	6,8

a. DF = степени свободы

b. SD = среднеквадратичное отклонение

c. %CV = коэффициент вариации в процентах

d. UCL = верхний доверительный предел доверительного интервала 95 %

Общая воспроизводимость субпопуляции %CD38^{ярк.} включает три первых компонента из описанных выше, а также воспроизводимость между донорами. См. табл. 10

Табл. 10. Воспроизводимость субпопуляции %CD38^{ярк.}

Популяция	DF	SD	%CV	UCL
CD138 ⁺	88	8,20	16,22	18,29

Повторяемость (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Два оператора выполняли по две независимые серии анализов в течение восьми дней на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II по очереди. Повторяемость CD38, CD28, CD27, CD19, CD117, CD81 и CD45 оценивалась с использованием контроля BD Multi-Check, дополненного контролем CD-Chex CD117 Plus. Повторяемость CD138 оценивалась с использованием костного мозга. Для каждой серии анализов каждым оператором было выполнено окрашивание двух контрольных образцов (контроля BD Multi-Check Control,

дополненного контролем CD-Chex CD117 Plus, или костного мозга) с использованием трех партий BD OneFlow PCD, сбор данных с использованием рабочего листа BD OneFlow PCD Acquisition и анализ с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Было определено процентное содержание клеточных популяций, положительно окрашенных на CD38, CD28, CD27, CD19, CD117, CD81 и CD45, в исходной популяции (субпопуляция %P). Было определено процентное содержание клеток CD138⁺ в популяции плазматических клеток CD38^{ярк.} (субпопуляция %CD38^{ярк.}) в костном мозге. Внутрианалитическая сходимость (повторяемость между пробирками) по показателю «Субпопуляция %P» была рассчитана для каждого антитела. См. табл. 11

Табл. 11. Повторяемость субпопуляции %P

Популяция	DF	SD	%CV	UCL
CD28 ⁺	96	0,37	0,50	0,56
CD27 ⁺	96	0,35	0,48	0,54
CD19 ⁺	96	0,25	1,71	1,91
CD81 ⁺	96	0,37	0,39	0,44
CD117 ⁺	96	0,10	1,77	1,99
CD45 ⁺	96	0,36	0,37	0,42
CD38 ⁺	96	0,77	2,01	2,25

Для CD138 была рассчитана повторяемость популяции %CD38^{ярк.} между пробирками. См. табл. 12

Табл. 12. Повторяемость субпопуляции %CD38^{ярк.}

Популяция	DF	SD	%CV	UCL
CD138 ⁺	96	2,69	5,32	5,95

Согласованность (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Было проведено сравнительное исследование работы системы BD OneFlow PCD с проточным цитометром BD FACSCanto II и системы EuroFlow PCD с проточным цитометром BD FACSCanto II. 48 образцов костного мозга было собрано в 2 внешних клинических центрах у пациентов с болезнями плазматических клеток, у пациентов с другими лейкозиями или лимфомами и у здоровых субъектов. Система BD OneFlow PCD включает настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, гранулы BD FC Beads для компенсации и реагент BD OneFlow PCD. Эталонная система EuroFlow PCD состоит из калибровочных частиц Sphero™ Rainbow (8 пиков), окрашенных в один цвет клеток для компенсации и смеси реагентов EuroFlow PCD. Популяция плазматических клеток из 48 образцов костного мозга была разделена на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны» с использованием двух систем. Было выполнено сравнение результатов.

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

Общий % согласованности = $((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100$

где

a = количество образцов, которые относятся к группе «Необходимы дополнительные анализы» согласно обеим системам;

b = количество образцов, которые согласно системе BD OneFlow относятся к группе «Необходимы дополнительные анализы», а согласно системе EuroFlow — к группе «Дополнительные анализы не нужны»;

c = количество образцов, которые согласно системе BD OneFlow относятся к группе «Дополнительные анализы не нужны», а согласно системе EuroFlow — к группе «Необходимы дополнительные анализы»;

d = количество образцов, которые относятся к группе «Дополнительные анализы не нужны» согласно обеим системам.

Результаты разделения плазматических клеток на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны» были представлены в форме таблицы. См. табл. 13.

Табл. 13. Согласованность разделения плазматических клеток на группы «Необходимы дополнительные анализы» или «Дополнительные анализы не нужны»

		Сравнительный метод (смесь Euroflow PCD)		Всего
		Необходимы дополнитель- ные анализы	Дополнитель- ные анализы не нужны	
Исследуемый метод (BD OneFlow PCD)	Необходимы дополнитель- ные анализы	22	0	22
	Дополнитель- ные анализы не нужны	0	26	26
	Всего	22	26	48

Общий % согласованности — 100 %.

Согласованность результатов, рассчитанных с нижним доверительным пределом 95 %, составила 93,9 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Образцы костного мозга, собранные в 2 внешних клинических лабораториях, были взяты у пациентов с болезнями плазматических клеток, у пациентов с другими гематологическими заболеваниями и у субъектов без гематологических отклонений. Парное сравнение образцов проводилось при помощи системы BD OneFlow PCD и системы EuroFlow PCD, описанных выше. Было определено процентное содержание плазматических клеток (CD45⁺, CD38⁺, CD138⁺) среди синглетов SSC. Статистика регрессии Деминга свидетельствует, что результаты, полученные с использованием двух систем, по существу эквивалентны. См. табл. 14

Табл. 14. Эквивалентность системы BD OneFlow и системы EuroFlow

Маркер	Объем выбор- ки	Свобод- ный член	Козффи- циент	Нижний 95%-й CL ^a козффи- циента	Верхний 95%-й CL козффи- циента
Плазматические клетки (% SSC)	48	0,26	0,92	0,83	1,08

а. ДП = доверительный предел

11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблемы, связанные с подготовкой или окрашиванием клеток

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и клеток	Образец был чрезмерно пермеабиллизирован	Повторите окрашивание. Инкубируйте пробирку с пермеабиллизующим раствором FIX & PERM Reagent B не более 15 минут
	Плохое качество образца	Проверьте жизнеспособность клеток
	Образец слишком старый	Возьмите новый образец и немедленно его окрасьте
Клетки слиплись после фиксации	Неполное ресуспендирование клеток перед фиксацией	Перед добавлением фиксирующего раствора FIX & PERM Reagent A встряхните пробирки на «вортексе», чтобы не осталось клеточных агрегатов
	Недостаточно тщательное промывание клеток после фиксации	После обработки фиксирующим раствором FIX & PERM Reagent A инкубируйте пробирки 2 минуты в темноте в промывочном буфере

Проблема	Возможная причина	Решение
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток
	Промытый образец не был окрашен в течение 30 минут после последней промывки	Приготовьте свежий образец и повторите окрашивание
	Пробирка BD OneFlow PCD слишком долго была на свету	Повторите окрашивание с использованием новой пробирки BD OneFlow PCD
	Сбор данных не был проведен в течение 1 часа после окрашивания	Повторите окрашивание свежего образца. Проведите сбор данных немедленно
Зарегистрировано слишком мало клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспандируйте свежий образец с более высокой концентрацией. Повторите окрашивание и сбор данных
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора. Дополнительную информацию см. в руководстве по эксплуатации цитометра

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow PCD на проточных цитометрах BD FACSLytic

Проблема	Возможная причина	Решение
Собрано недостаточно нужных клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспандируйте свежий образец с более высокой концентрацией. Повторите окрашивание и сбор данных
	Слишком низкое значение по умолчанию — 100 000 событий для сбора	Измените количество событий для сбора. Повторите окрашивание и сбор данных. См. <i>Руководство по применению системы BD OneFlow™ при болезнях плазматических клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™</i> .

Проблема	Возможная причина	Решение
Аномальный точечный график FSC-A против SSC-A	Необходима настройка цитометра	Обратитесь в компанию BD Biosciences
Файл CSV и отчет не экспортируются автоматически	Номер партии реагента и срок годности не были вручную добавлены в библиотеку	1. Добавьте номер партии реагента и срок годности в библиотеку. 2. Экспортируйте файл CSV и PDF-отчет вручную. См. <i>Инструкции по эксплуатации клинической системы BD FACSLyric™</i>

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow PCD на проточных цитометрах BD FACSCanto II

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора. Подробнее см. в <i>Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™</i>
Некоторые точечные графики недоступны	Не выбраны FSC-H и SSC-H при создании параметров приложения	Убедитесь, что FSC-H и SSC-H выбраны на вкладке Parameters (Параметры) окна Inspector (Инспектор)
Не удается отсканировать штрихкод на этикетке пробирки BD OneFlow PCD	Штрихкод на этикетке пробирки испорчен	Отсканируйте штрихкод на этикетке пакета с пробирками BD OneFlow PCD в поле Product ID (Идентификатор продукта) в разделе Experiment Layout (План эксперимента). Затем вручную введите точку с запятой (;) и шестизначный код пробирки, который указан рядом со штрихкодом на этикетке пробирки, после последней цифры штрихкода
На рабочих листах отсутствуют точечные графики, или на точечных графиках отсутствуют гейты	Шаблон импортирован неправильно	1. Закройте текущий эксперимент. 2. Создайте новый эксперимент. 3. Повторно импортируйте шаблон OneFlow PCD

Проблема	Возможная причина	Решение
Некоторые ключевые слова отсутствуют в таблице статистики на рабочем листе анализа данных	Программное обеспечение BD FACSDiva не импортировало некоторые ключевые слова в шаблон панели	1. В окне Browser (Средство просмотра) установите указатель текущей пробирки на анализируемую пробирку. 2. Перейдите на рабочий лист анализа данных. 3. Щелкните таблицу статистики правой клавишей мыши и выберите Edit Stats View (Редактировать отображение статистики). 4. На вкладке Header (Заголовок) установите флажок All (Все). 5. Нажмите OK.
Заявление For in vitro diagnostic use (Для использования в диагностике in vitro) отсутствует в нижнем колонтитуле распечатанного рабочего листа анализа данных	Изменены размеры полей листа при печати	1. В строке меню программного обеспечения BD FACSDiva выберите File > Page Setup (Файл > Параметры страницы). 2. Убедитесь, что все поля составляют 2,54 см или 1 дюйм в зависимости от стандартов по умолчанию. 3. Нажмите OK.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В СООТВЕТСТВИИ С НАСТОЯЩИМ ДОКУМЕНТОМ ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА РАСПРОСТРАНЯЮТСЯ НА ПРОДАННЫЕ ИЗДЕЛИЯ ТОЛЬКО С ЦЕЛЬЮ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И СОДЕРЖИМОГО, ЗАЯВЛЕННОГО НА ЭТИКЕТКЕ ИЛИ НА МАРКИРОВКЕ ИЗДЕЛИЯ В МОМЕНТ ДОСТАВКИ ЕГО ЗАКАЗЧИКУ. КОМПАНИЯ ВО ОТКАЗЫВАЕТСЯ ОТ ВСЕХ ДРУГИХ ГАРАНТИЙ, ЯВНЫХ ИЛИ НЕЯВНЫХ, ВКЛЮЧАЯ ГАРАНТИИ ПРИГОДНОСТИ И СООТВЕТСТВИЯ ДЛЯ ЛЮБОЙ КОНКРЕТНОЙ ЦЕЛИ, А ТАКЖЕ ГАРАНТИИ НЕНАРУШЕНИЯ ПАТЕНТОВ. ИСКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ ВО ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЗАМЕНОЙ ИЗДЕЛИЙ ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ПОКУПНОЙ ЦЕНЫ. КОМПАНИЯ ВО НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА МАТЕРИАЛЬНЫЙ УЩЕРБ ИЛИ ЛЮБЫЕ СЛУЧАЙНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ, ВКЛЮЧАЯ ТРАВМЫ ИЛИ ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОТЕРИ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗДЕЛИЕМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26:1908-1975.
- 2 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26:1986-2010.
- 3 Ling NR, MacLennan ICM, Mason DY. B-cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leukocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:302-335.
- 4 Olive D, Cerdan C, Costello R, et al. CD28 and CTLA-4 cluster report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:360-370.
- 5 Kobata T, Morimoto C. CD27 Workshop Panel Report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AE, et al, eds. *Leukocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Garland Publishing, Inc.; 1997:67-69.
- 6 Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and Comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-43.
- 7 Ashman LK, Cambareri AC, Nguyen L, Bühring H-J. CD117 Workshop Panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, et al, eds. *Leukocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Garland Publishing, Inc; 1997:816-818.
- 8 Tedder TF, Wagner N, Engel P. CD81 Workshop report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. Vol 1. New York, NY: Oxford University Press; 1995:684-688.

- 9 Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
- 10 Appendix C. Summary of antibody names, code numbers, and donor laboratories. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:988-993.
- 11 Horvathova M, Gaillard JP, Liautard J, et al. Identification of novel and specific antigens of human plasma cells by mAb. In: Schlossman S, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:713-714.
- 12 Wijdenes J, Clément C, Klein B, Dore J-M. CD138 (syndecan-1) Workshop Panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AE, et al, eds. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Garland Publishing, Inc; 1997:249-252.
- 13 Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
- 14 Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy PJ, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
- 15 Nicholson JKA, Green TA. Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping: effect of specimen age on results. *J Immunol Methods*. 1993;165:31-35.
- 16 Paxton H, Bendele T. Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann NY Acad Sci*. 1993;677:440-443.
- 17 Davis BH, Dasgupta A, Kussick S, Han JY, Estrellado A; on behalf of ICSH/ICCS working group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part II - preanalytical issues. *Cytometry Part B* 2013;84B:286-290.
- 18 Stetler-Stevenson M, Greig B, Yuan C. Flow cytometric specimen collection, processing, and reporting. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, eds. *Laboratory Hematology Practice*. First Edition. Hoboken, NJ; Wiley-Blackwell Inc.; 2012:105-114.
- 19 Stetler-Stevenson M, Ahmad E, Barnett D, et al. *Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H43-A2.
- 20 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
- 21 Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html>. Accessed March 12, 2019.

ИСТОРИЯ

Редакция	Дата	Внесенные изменения
23-16874-00	2/2016	Первый выпуск
23-16874-01	5/2020	Переработано для поддержки использования продукта на проточных цитометрах BD FACSLyric

BD OneFlow™ B-CLPD T1

Набор на 20 анализов — номер по
каталогу 659293

IVD

CE

BD, логотип BD, FACSCanto, FACSDiva, FACSLytic, FACSuite, Horizon, OneFlow и Vacutainer являются товарными знаками компании Becton, Dickinson and Company или ее аффилированных компаний. Все остальные товарные знаки принадлежат соответствующим владельцам. © BD, 2020. Все права защищены.



5/2020

23-17203-02



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA

Australian and New Zealand
Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Rd
Macquarie Park NSW 2113
Australia

EC REP

Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

Becton Dickinson Ltd.
14b George Bourke Drive
Mt Wellington, Auckland, 1060
New Zealand

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.53.720.600
help.biosciences@bd.com

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ	5
3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ	6
4. РЕАГЕНТ	7
Состав реагента	7
Меры предосторожности	8
Хранение и обращение	9
5. ПРИБОРЫ	10
6. ОБРАЗЦЫ	11
7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ	12
Предоставляемые реагенты	12
Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы	12
8. ПРОЦЕДУРА	14
Установка анализа или шаблона OneFlow B-CLPD T1	14
Настройка цитометра	16
Разведение лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution	18
Подготовка образца	18
Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLytic)	21
Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)	23
Сбор данных окрашенного образца	26

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical	30
Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva	32
9. ОГРАНИЧЕНИЯ	35
10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	35
Проточный цитометр BD FACSLytic	35
Проточный цитометр BD FACSCanto II	42
11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ	46
ГАРАНТИЯ	49
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	50
ИСТОРИЯ	51

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Пробирка BD OneFlow™ B-CLPD T1 (B-cell Chronic Lymphoproliferative Diseases Tube 1 — пробирка 1 для исследования хронических лимфопролиферативных заболеваний В-клеток) предназначена для исследования популяций В-клеток в образцах, для которых установлена необходимость дальнейшего исследования, в сочетании с пробиркой BD OneFlow™ LST (Lymphoid Screening Tube — пробиркой для лимфоидного скрининга). Пробирка BD OneFlow B-CLPD T1 предназначена для проточно-цитометрического иммунофенотипирования В-клеток в периферической крови и костном мозге в качестве вспомогательного средства при диагностике хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и других хронических лимфопролиферативных заболеваний В-клеток. Пробирка BD OneFlow B-CLPD T1 предназначена для использования с соответствующим образом оснащенным проточным цитометром компании BD и программным обеспечением для диагностики *in vitro*.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

При хронических лимфопролиферативных заболеваниях (CLPD) клоногенные события ведут к экспансии и накоплению зрелых на вид лимфоцитов, которые обладают преимуществом пролиферации и (или) живучести над своими нормальными двойниками¹. Таким образом, обнаружение фенотипически аномальных и клональных зрелых лимфоцитов крайне важно для диагностики CLPD.

Консорциум EuroFlow™* разработал многоцветные панели антител для полного описания клеточных популяций в образце пациента при помощи иммунофенотипических маркеров, характерных для нормальных и аномальных клеток¹. В дополнение

* Товарный знак и логотип EuroFlow и панели антител EuroFlow™ являются собственностью консорциума EuroFlow и не могут быть воспроизведены или опубликованы без предварительного письменного разрешения координатора EuroFlow (www.euroflow.org).

к оптимизированным многоцветным панелям антител протокол EuroFlow содержит стандартизованные процедуры настройки цитометра, определения настроек анализа, подготовки и окрашивания образца, сбора и анализа данных².

Диагностический алгоритм EuroFlow для идентификации и классификации нарушений со стороны кроветворной системы включает скрининговые панели с использованием одной пробирки и классификационные панели с использованием нескольких пробирок. Каждая пробирка содержит набор опорных маркеров и набор классификационных маркеров¹. Опорные маркеры, общие для определенного набора панелей, используются для нормализации образцов, чтобы файлы данных можно было объединять и анализировать как один большой файл данных. Это маркеры, идентифицирующие отдельные клеточные популяции в конкретной клеточной линии. Классификационные маркеры выбраны за диагностическую способность различать типы клеток в заданной клеточной линии и классифицировать аномальный тип клеток в образце.

3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ

Многopараметрическая проточная цитометрия — чувствительный и быстрый инструмент для качественного и количественного описания клеточных популяций в образце. Клетки инкубируются с конъюгированными с флуорохромом антителами, которые связываются со своими целевыми молекулами. Окрашенные клетки затем можно анализировать как одиночные. Многopараметрический анализ данных используется для идентификации клеточных популяций в образце пациента и может привести к идентификации аномальной клональной клеточной популяции.

Количество параметров, используемых при проточно-цитометрическом иммунофенотипировании нарушений со стороны кроветворной системы, в последние годы возросло. BD OneFlow B-CLPD T1 содержит панель конъюгированных с флуорохромом антител, которые в сочетании с антителами из пробирки BD OneFlow LST позволяют отличить образцы пациентов с ХЛЛ от образцов пациентов с другими хроническими лимфопролиферативными заболеваниями В-клеток. Анализ точечных графиков позволяет классифицировать аномальные В-клетки как результат ХЛЛ или другого хронического лимфопролиферативного заболевания В-клеток.

4. РЕАГЕНТ

Состав реагента

BD OneFlow B-CLPD T1 состоит из одноразовых пробирок, содержащих следующие конъюгированные с флуорохромом антитела в оптимизированной высушенной форме. См. табл. 1.

Табл. 1. Панель антител BD OneFlow B-CLPD T1

Антитело	Флуорохром	Клон	Изотип
CD23	FITC	EBVCS-5 (Leu20) ^{3,4}	IgG ₁ , κ
CD10	PE	HI10a ⁵	IgG ₁ , κ
CD79b	PerCP-Cy TM 5.5 ^a	SN8 ⁶	IgG ₁ , κ
CD19	PE-Cy TM 7	SJ25-C1 ^{3,7}	IgG ₁ , κ
CD200	APC	MRC OX-104 ^{8,9}	IgG ₁ , κ
CD43	APC-H7	1G10 ¹⁰	IgG ₁ , κ
CD20	V450 ^b	L27 ⁷	IgG ₁ , κ
CD45	V500-C ^b	2D1 (анти-HLe-1) ^{11,12}	IgG ₁ , κ

-
- а. Су™ является товарным знаком компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Карнеги — Меллон (Carnegie Mellon University), изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других способов применения. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта и вы не можете ее получить, верните этот продукт нераспакованным в компанию BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.
- б. BD Horizon™ V450, BD Horizon™ V500-C

Антитела в пробирке BD OneFlow B-CLPD T1 в сочетании с антителами в пробирке BD OneFlow LST позволяют отличать образцы пациентов с ХЛЛ от образцов пациентов с другими хроническими лимфопролиферативными заболеваниями В-клеток.

Антитела CD45, CD19 и CD20 присутствуют в BD OneFlow LST и BD OneFlow B-CLPD T1 и служат опорными маркерами, позволяя напрямую сравнивать образцы, окрашенные с использованием этих двух пробирок.

CD23, CD200, CD79b, CD43 и CD10 — это классификационные маркеры, которые вместе с CD5 и CD38 из пробирки BD OneFlow LST позволяют классифицировать образцы как образцы пациентов с ХЛЛ или другими хроническими лимфопролиферативными заболеваниями В-клеток. Антитела Anti-Kappa и Anti-Lambda в пробирке BD OneFlow LST используются для оценки клональности популяции В-клеток.

Полное описание возможностей антител, выбранных для пробирки BD OneFlow B-CLPD T1, см. в статье с описанием панелей антител EuroFlow¹.

Меры предосторожности

- Реагент содержит от 0,25 до < 1 % 5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-она и 2-метил-4-изотиазолин-3-она (3 : 1) (номер CAS 2682-20-4) и от 0,1 до < 0,25 % азида натрия (номер CAS 26628-22-8). В Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ (GHS) этот реагент

классифицирован как опасный. Перейдите на regdocs.bd.com для загрузки паспорта безопасности вещества.

	Предупреждение
	H317: Может вызывать аллергическую кожную реакцию. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.
Предотвращение	P261: Избегать вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / вещества в распыленном состоянии. P272: Не выносить загрязненную одежду с места работы. P280: Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз/лица. P273: Не допускать попадания в окружающую среду.
Ответные меры	P302 + P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды. P333 + P313: При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу. P321: Применение специальных мер (см. паспорт безопасности материала). P363: Постирать загрязненную одежду перед последующим использованием.
Утилизация	P501: Утилизировать содержимое/контейнер на подходящем объекте по обработке и утилизации отходов в соответствии с применимыми законами и постановлениями, характеристиками продукта на момент утилизации.

Хранение и обращение

Храните пробирки при температуре 2–27 °C в пакетах из фольги. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. При соблюдении надлежащих условий хранения высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны до истечения срока годности, указанного на пакете и этикетках пробирок. Не используйте реагент после истечения срока хранения. При соблюдении надлежащих условий хранения

высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны в течение одного месяца после вскрытия пакета.

ВНИМАНИЕ! Как следует закрыть пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Во избежание образования конденсата открывайте пакет только после того, как его температура сравняется с комнатной. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

5. ПРИБОРЫ

BD OneFlow B-CLPD T1 предназначен для использования на следующих инструментах BD.

Табл. 2. Рекомендованные инструменты BD

Проточный цитометр	Настроечные гранулы	Настроечное программное обеспечение	Аналитическое программное обеспечение
BD FACSLytic™ ^{Ma}	Гранулы BD® CS&T Beads Семицветный комплект гранул BD® FC Beads 7-Color Kit Пятицветный комплект гранул BD® FC Beads 5-Color Kit	Программное обеспечение BD FACSuite™ Clinical версии 1.4 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии
BD FACSCanto™ II ^b	Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads Настроечные гранулы BD OneFlow™ Setup Beads Восьмицветный комплект гранул BD® FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow™	Программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии

- a. 8-цветная конфигурация (4 синих, 2 красных, 2 фиолетовых), 10-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) или 12-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 5 фиолетовых)
- b. 3-лазерная, 8-цветная оптическая конфигурация BD 4-2H-2V по умолчанию (4-2H-2V)

6. ОБРАЗЦЫ

BD OneFlow B-CLPD T1 можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии периферической крови и аспиратов костного мозга, собранных в пробирки с ЭДТА или гепарином^{13–16,19–21} (например, пробирки BD Vacutainer® blood collection tubes), а также свежих лимфатических узлов, собранных в PBS или питательной среде для выращивания культур клеток, например RPMI. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{13,14,19}.

Образцы необходимо обрабатывать сразу после сбора или в течение до 24 часов после сбора в случае хранения при комнатной температуре (20–25 °C)^{15,16,20,21}. Если обработка проводится не сразу после сбора, лаборатория должна подтвердить, что образцы, которые обрабатываются и хранятся в соответствии с процедурами данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, обработанных сразу после сбора.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендованное предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток¹³.

Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °C в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных

хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{17,18} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Предоставляемые реагенты

Реагент BD OneFlow B-CLPD T1 предоставляется в виде одноразовых пробирок в пакетах из фольги. В каждом наборе содержится четыре пакета, в каждом из которых по пять пробирок BD OneFlow B-CLPD T1.

Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- BD OneFlow™ Assays Installer I (Инсталлятор I для анализов BD OneFlow™) (номер по каталогу 664225)

Для анализа OneFlow B-CLPD T1 необходимо использовать инсталлятор. Анализ содержит лист сбора данных, лабораторный отчет, отчет лечащего врача и дополнительный отчет, который используется для дальнейшего обследования. Если у вас еще нет текущей версии анализа OneFlow LST, инсталлятор необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow B-CLPD T1. Инсталлятор также содержит анализы для других реагентов BD OneFlow™.

Руководство по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопролиферативных заболеваниях В-клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™ предоставляется вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Инсталлятор шаблонов для анализов BD OneFlow™ (номер по каталогу 659305)

Для шаблона OneFlow B-CLPD T1 необходимо использовать инсталлятор. Шаблон содержит два общих рабочих листа: рабочий лист OneFlow B-CLPD T1 Acquisition и рабочий лист OneFlow B-CLPD T1 Analysis. Если у вас еще нет текущей версии шаблона OneFlow B-CLPD T1, инсталлятор необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow B-CLPD T1. Инсталлятор также содержит шаблон OneFlow Setup и шаблоны для других реагентов BD OneFlow.

Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™ и Руководство по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопролиферативных заболеваниях В-клеток поставляются вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

- Конические полипропиленовые пробирки объемом 15 мл.
- Пастеровская пипетка.
- Серологическая пипетка.
- Микропипетка с наконечниками.
- Мешалка «вортекс».
- Центрифуга.
- Промывочный буфер (фильтрованный PBS + 0,5 % BSA + 0,09 % или 0,1 % азида натрия).

-
- Лизирующий раствор BD FACST[™] Lysing Solution (10×) (номер по каталогу 349202).

Предупреждения и меры предосторожности см. в инструкции по эксплуатации лизирующего раствора *BD FACST[™] Lysing Solution*.

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- Гранулы BD CS&T Beads (номер по каталогу 656504 или 656505).
- Семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit (№ по каталогу 656867).
- Пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit (№ по каталогу 661564).

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads (номер по каталогу 656046 или 656047).
- Настраечные гранулы BD OneFlow Setup Beads (номер по каталогу 658620).
- Восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow (номер по каталогу 658621).

8. ПРОЦЕДУРА

Установка анализа или шаблона OneFlow B-CLPD T1

Анализ OneFlow B-CLPD T1, используемый с программным обеспечением BD FACSuite Clinical, или шаблон OneFlow B-CLPD T1, используемый с программным обеспечением BD FACSDiva, необходимо установить до первого запуска анализа. Одновременно с этим при необходимости можно установить дополнительные анализы или шаблоны. Если анализ файлов FCS осуществляется на отличной от использовавшейся для сбора данных образцов рабочей станции, анализы или шаблоны необходимо установить на обе рабочие станции.

Для установки анализа OneFlow в программном обеспечении BD FACSuite Clinical необходимо выполнить следующие действия.

-
1. Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.
Откроется мастер установки анализов BD OneFlow InstallShield.
 2. Щелкните **Next** (Далее).
Откроется лицензионное соглашение.
 3. Выберите вариант **I accept the terms in the license agreement** (Я принимаю условия лицензионного соглашения) и нажмите **Next** (Далее).
 4. Чтобы установить все анализы, имеющиеся на инсталляторе, выберите опцию **Complete** (Полная установка) и нажмите **Next** (Далее).
 5. Необязательно: Чтобы установить анализы, имеющиеся на инсталляторе, выборочно, укажите вариант **Custom** (Пользовательская установка) и нажмите **Next** (Далее).
Откроется диалоговое окно **Custom Setup** (Пользовательская настройка).
 - Нажмите на меню слева от соответствующего анализа.
 - В меню выберите **This assay will be installed on your local hard drive** (Этот анализ будет установлен на жесткий диск).
 6. Нажмите **Install** (Установить).
Анализы будут установлены в Library (Библиотека).
 7. Выберите **Finish** (Готово).
Мастер установки анализов InstallShield закроется.
 8. Необязательно: дважды щелкните ознакомительный файл (ReadMe), расположенный на инсталляторе.
Откроется ознакомительный файл (ReadMe).
 9. Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.

10. Извлеките инсталлятор.

Для установки шаблона OneFlow в программном обеспечении BD FACSDiva необходимо выполнить следующие действия.

ПРИМЕЧАНИЕ При выборе шаблона для установки он записывается поверх шаблона с таким же именем, если таковой был установлен в системе. Если вы не хотите, чтобы имеющийся на вашем компьютере шаблон был перезаписан, не выбирайте этот шаблон в установщике в процессе установки.

1. Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.
2. Следуйте инструкциям в диалоговом окне.

Инсталлятор скопирует и вставит шаблоны в папку
D:\BDExport\Templates\Panel\BD Panels.

ПРИМЕЧАНИЕ Если в вашей системе всего один жесткий диск, шаблоны будут установлены в папку C:\BDExport\Templates\Panel\BD Panels.

По завершении установки откроется диалоговое окно с сообщением, какие шаблоны успешно скопированы в папку.

3. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть диалоговое окно.
4. Откроется ознакомительный файл инсталлятора (ReadMe). Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.
5. Извлеките инсталлятор.

Настройка цитометра

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

1. Для осуществления контроля качества определения характеристик (CQC) каждые 6 месяцев или по необходимости, ежедневного контроля качества работы (PQC), ежедневной настройки анализов и параметров пробирок используйте гранулы BD CS&T Beads и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.

-
2. Для обновления эталонных настроек каждые 60 дней используйте семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.

Обратитесь к *Инструкциям по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™* и *BD FACSLytic™ Clinical Reference System* (Справочная клиническая система BD FACSLytic™), а также документации по соответствующему реагенту для получения дополнительной информации.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads (CS&T IVD Beads) и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для установки базового уровня цитометра и проведения ежедневных проверок работоспособности.
2. Используйте настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, лизированную промытую кровь и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной настройки напряжений фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) и детекторов светорассеяния.
3. Используйте гранулы BD FC Beads и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной установки компенсации флуоресценции.
4. Рекомендуется убедиться, что напряжения ФЭУ (PMTV) находятся в ежедневных целевых диапазонах.

Подробную информацию см. в *Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™* и документации по соответствующему реагенту.

Разведение лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution

Разведите 10-кратный концентрат в соотношении 1:10 деионизированной водой комнатной температуры (20–25 °C). Готовый раствор стабилен в течение 1 месяца при условии хранения в контейнере из стекла или полиэтилена высокой плотности (HDPE) при комнатной температуре.

Подготовка образца

Промывка образца

ПРИМЕЧАНИЕ Перед промывкой образца убедитесь, что цитометр правильно настроен.

1. Нанесите идентификатор образца на коническую пробирку объемом 15 мл.
2. Десять раз переверните пробирку с образцом, чтобы как следует перемешать ее содержимое.
3. Добавьте в помеченную коническую пробирку 300 мкл образца.
4. Добавьте 10 мл промывочного буфера (фильтрованный PBS + 0,5 % BSA + 0,09 % или 0,1 % азида натрия).
5. Переверните пробирку 3–5 раз, чтобы как следует перемешать ее содержимое.
6. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
7. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок.
8. Перед добавлением промывочного буфера встряхните пробирку на «вортексе», чтобы не осталось клеточных агрегатов.
9. Повторите шаги 4–8 еще два раза — итого три промывки.

10. Ресуспендируйте клеточный осадок в 200 мкл промывочного буфера до конечного объема приблизительно 300 мкл.

ПРИМЕЧАНИЕ Приступите к окрашиванию образца при помощи BD OneFlow B-CLPD T1 в течение 30 минут после последней промывки. До окрашивания храните промытый образец при 20–25 °С. Образец пациента необходимо окрасить при помощи обеих пробирок — BD OneFlow LST и BD OneFlow B-CLPD T1. Дополнительную информацию см. в *Руководстве по применению BD OneFlow™ LST* или соответствующем *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопролиферативных заболеваниях В-клеток*.

Окрашивание образца

11. Если пакет хранился в холодильнике, не открывайте пакет, пока он не нагреется до комнатной температуры.

ПРИМЕЧАНИЕ Реагент очень чувствителен к влаге. Во избежание образования конденсата открывайте пакет, только если его температура равна комнатной.

12. Извлеките из пакета по пробирке BD OneFlow B-CLPD T1 для каждого образца пациента.
13. Поместите пробирки в штатив, защищенный от света.

Приступите к окрашиванию образца в течение часа после изъятия пробирки из пакета.

14. Немедленно закройте пакет с неиспользованными пробирками.

ПРИМЕЧАНИЕ Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

15. Напишите идентификатор пациента в соответствующем месте на этикетке пробирки BD OneFlow B-CLPD T1.

ПРИМЕЧАНИЕ Вскрыв пакет, напишите на этикетке пакета текущую дату. Используйте все пробирки из пакета в течение месяца, прежде чем вскрывать новый.

16. Встряхните промытый образец на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать.
17. Добавьте в пробирку 100 мкл промытого образца. Энергично встряхните в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.

Если используется меньше 100 мкл образца, добавьте промывочный буфер до конечного объема 100 мкл.

ПРИМЕЧАНИЕ Не протирайте внешнюю поверхность пробирки этиловым или изопропиловым спиртом, чтобы не смазать напечатанную этикетку.

18. Инкубируйте в течение 30 минут при 20–25 °C в темном месте.
19. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
20. Инкубируйте в течение 10 минут при 20–25 °C в темном месте.
21. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
22. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
23. Энергично встряхните на «вортексе» до полного ресуспендирования клеточного осадка.
24. Добавьте в пробирку 2 мл промывочного буфера. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
25. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.

26. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
27. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы ресуспендировать клеточный осадок.
28. Добавьте в пробирку 200 мкл промывочного буфера. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.

ПРИМЕЧАНИЕ Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °C в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLyric)

Добавьте идентификатор партии реагента и срок годности в библиотеку следующим образом.

1. На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок Library (Библиотека).
Откроется рабочая область Library (Библиотека).
2. Откройте меню **Beads and Reagents** (Гранулы и реагенты) и выберите **Reagents** (Реагенты).
3. В списке **Product Name** (Наименование изделия) выберите OneFlow B-CLPD T1.

В нижней части страницы появится панель **OneFlow B-CLPD T1**.

-
- Щелкните **Add Lot** (Добавить партию).
 - Откроется диалоговое окно **Add New Lot** (Добавить новую партию).
 - Вручную введите **Lot ID** (Идентификатор партии), указанный на этикетке пробирки.
 - Нажмите на значок календаря и выберите на календаре дату истечения срока годности, указанную на этикетке пробирки.
 - Установите флажок **Current Lot** (Текущая партия).
 - Нажмите **ОК**.

Идентификатор партии и срок годности будут добавлены в соответствующие поля сведений о реагенте.

ПРИМЕЧАНИЕ Убедитесь, что идентификатор партии реагента и срок годности добавлены в сведения о реагенте до начала сбора данных образцов. Эту процедуру необходимо выполнить только один раз для одной партии реагентов.

Порядок создания рабочей процедуры:

- На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок **Worklists** (Рабочие процедуры).
Откроется рабочая область **Worklists** (Рабочие процедуры).
- На вкладке **Manage Worklists** (Управление рабочими процедурами) нажмите кнопку **New** (Новая).
В новой вкладке откроется пустая рабочая процедура.
- В разделе **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры) выберите в меню **Task** (Задача) нужную задачу.

4. Для задач, связанных с реагентами OneFlow, введите **Sample ID** (Идентификатор образца) вручную.

Не сканируйте штрихкод на этикетке пробирки в программное обеспечение.

ПРИМЕЧАНИЕ Разные партии одного и того же реагента нельзя использовать в рамках одной рабочей процедуры.

5. В разделе **Loading Options** (Параметры загрузки) выберите **Manual** (Вручную) в меню **Loading Option** (Параметры загрузки).

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)

1. В строке меню выберите **Edit > User Preferences** (Редактировать > Настройки пользователя), перейдите на вкладку **FCS** и выберите **Export FCS after recording** (Экспорт FCS после записи) для автоматического экспорта файлов FCS после сбора данных. Нажмите **OK**.

2. Убедитесь, что выбрана конфигурация цитометра по умолчанию 4-2H-2V.

3. В строке меню выберите **Experiment > New Experiment > Blank Experiment** (Эксперимент > Новый эксперимент > Пустой эксперимент). Нажмите **OK**.

ПРИМЕЧАНИЕ Также эксперимент можно создать непосредственно из окна **Browser** (Средство просмотра), щелкнув значок **Experiment** (Эксперимент).

4. Если отображается диалоговое окно **CST Mismatch** (Несовпадение CST), выберите **Use CST Settings** (Использовать параметры CST).
5. Переименуйте эксперимент в соответствии с правилами лаборатории.

-
- В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Link Setup** (Настройки цитометра > Привязать настройки) и выберите соответствующую матрицу компенсации, рассчитанную с использованием гранул BD FC Beads в течение последних 31 суток. Щелкните **Link** (Привязать).

См. инструкцию по эксплуатации восьмицветного комплекта гранул *BD® FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow™* или *Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™*.

- Если отображается диалоговое окно **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), выберите **Overwrite** (Перезаписать).
- Щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Unlink From** (Настройки цитометра > Отменить связь с [ранее связанной настройкой компенсации]). Нажмите **OK**.

ПРИМЕЧАНИЕ Отмена связи с настройкой компенсации позволяет применить обновленные параметры приложения, сохранив значения компенсации.

- В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Application Settings > Apply** (Настройки цитометра > Параметры приложения > Применить) и выберите самые последние параметры приложения, определенные за последние 31 сутки с использованием настроечных гранул BD OneFlow Setup Beads. Щелкните **Apply** (Применить).
- Откроется диалоговое окно **Confirm** (Подтвердить). Выберите **Keep the compensation value** (Сохранить значение компенсации).
- При появлении диалогового окна **Confirm Cytometer Changes** (Подтвердить изменения настроек цитометра) щелкните **Yes** (Да), чтобы перезаписать значения настроек цитометра для **FSC Area Scaling** (Масштабирование области FSC).

-
12. В строке меню выберите **Experiment > New Specimen** (Эксперимент > Новый образец).

Откроется диалоговое окно **Panel Templates** (Шаблоны панели).

13. Перейдите на вкладку **BD Panels** (Панели BD) и выберите шаблон **OneFlow B-CLPD T1**.
14. Укажите количество образцов пациентов, для которых необходимо выполнить сбор данных, в поле **Copies** (Копии) внизу вкладки **BD Panels** (Панели BD). Нажмите **OK**.
15. Переименуйте образцы, например укажите соответствующие идентификаторы пациента перед названиями образцов.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости повторить запуск конкретного образца пациента установите указатель текущей пробирки на пробирку, запуск которой нужно повторить. Нажмите кнопку **Next Tube** (Следующая пробирка) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы создать еще одну пробирку для этого пациента. Не используйте для создания дополнительной пробирки пункт меню **Experiment > New Tube** (Эксперимент > Новая пробирка) или значок **New Tube** (Новая пробирка) в строке меню **Browser** (Средство просмотра), поскольку в таком случае поля этикеток и штрихкода заполнены не будут.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости выполнить сбор данных для других образцов пациентов, окрашенных BD OneFlow B-CLPD T1, в данном эксперименте повторите шаги 12–15, чтобы добавить новые образцы. Откроются два диалоговых окна **Confirm** (Подтвердить) с вопросами, хотите ли вы создать еще один рабочий лист сбора данных B-CLPD T1 или рабочий лист анализа данных B-CLPD T1. Нажмите **Cancel** (Отмена) в каждом диалоговом окне.

16. В строке меню выберите **Experiment > Experiment Layout** (Эксперимент > План эксперимента) и перейдите на вкладку **Keywords** (Ключевые слова).

17. Выделите ключевое слово **Product ID** (Идентификатор продукта) для соответствующей пробирки и отсканируйте штрихкод на этикетке пробирки BD OneFlow B-CLPD T1.

ПРИМЕЧАНИЕ Если отсканировать штрихкод на этикетке пробирки не удастся, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

18. Вручную добавьте необходимую информацию в оставшиеся ключевые слова.
19. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть **Experiment Layout** (План эксперимента).

Сбор данных окрашенного образца

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

Анализ автоматически соберет 100 000 событий. После начала сбора данных невозможно изменить количество событий. Поэтому, если необходимо изменить количество событий, сделайте это до начала сбора данных. Инструкции по изменению количества событий для сбора см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопролиферативных заболеваниях В-клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

Чтобы собрать данные образца, выполните следующие действия.

1. Нажмите **Run All** (Выполнить все) в меню **Run** (Выполнить) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы выполнить рабочую процедуру с самого начала.

Либо, чтобы собрать данные для конкретной пробирки, наведите указатель выполнения на образец, для которого необходимо выполнить сбор, и нажмите **Run from Pointer** (Выполнить, начиная с положения указателя) в меню **Run** (Выполнить).

2. Встряхните каждую окрашенную пробирку на «вортексе» в течение 3–5 секунд на низкой скорости непосредственно перед сбором данных пробирки.

3. Следуйте подсказкам в программном обеспечении, чтобы загрузить или извлечь пробирки.

Откроется рабочий лист сбора данных OneFlow B-CLPD T1 Acquisition. Рабочий лист сбора данных содержит точечные графики и гейты, позволяющие идентифицировать лейкоциты, лимфоциты и В-клетки.

4. Исследуйте каждый точечный график на рабочем листе сбора данных.

ПРИМЕЧАНИЕ Время предварительного просмотра составляет 10 секунд, затем данные записываются автоматически. Не увеличивайте время предварительного просмотра и не используйте недостаточный объем образца во избежание риска его потери.

5. Если предполагается собрать менее 100 000 событий, отслеживайте объем образца и нажмите **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор данных до опустошения пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Анализ автоматически соберет 100 000 событий. Если это невозможно, сбор прекращается по истечении 5 минут. Однако необходимо отслеживать объем образцов и нажать **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор до опустошения пробирки. Инструкции по изменению критериев остановки см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопролиферативных заболеваниях В-клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. В окне **Browser** (Средство просмотра) разверните соответствующий образец и установите указатель текущей пробирки на нужную.
2. Выберите вкладку рабочего листа **BD OneFlow B-CLPD T1 Acquisition**.
3. Встряхните окрашенную пробирку в течение 3–5 секунд на низкой скорости.
4. Установите пробирку в цитометр. Установите скорость потока на **Medium** (Средняя) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных). Щелкните **Acquire Data** (Сбор данных).
5. Убедитесь, что популяция охвачена шкалой, и отрегулируйте гейт на первом графике рабочего листа сбора данных B-CLPD T1, чтобы исключить примеси, если необходимо.
6. Щелкните **Record Data** (Регистрировать данные) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы собрать нужное количество событий.

ПРИМЕЧАНИЕ Шаблон автоматически собирает 100 000 событий². При необходимости используйте меню в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы выбрать другое количество событий для сбора. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

7. Изучите точечные графики на рабочем листе сбора данных B-CLPD T1 и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Для идентификации клеток используется точечный график FSC-A против SSC-A.

Точечный график CD45 V500-A против SSC-A содержит два гейта: один для идентификации лейкоцитов, другой для идентификации лимфоцитов. Т-клетки и В-клетки идентифицируются на точечном графике популяции лимфоцитов CD19 PE-Cy7-A против CD20 V450-A.

Оставшиеся точечные графики гейтов не содержат и включены в качестве гарантии окрашивания антителами клеток образца, то есть внутреннего контроля качества окрашивания пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток на рабочем листе сбора данных B-CLPD T1 см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопролиферативных заболеваниях В-клеток*.

8. Соберите данные следующего образца.
9. В строке меню выберите **File > Export > Experiments** (Файл > Экспортировать > Эксперименты) и выберите параметр **Directory Export** (Экспортировать каталог). Нажмите **OK**.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical

1. Наведите указатель выполнения на соответствующий образец на панели **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры).

OneFlow B-CLPD T1 Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow B-CLPD T1) откроется во вкладке **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).

2. Ознакомьтесь с OneFlow B-CLPD T1 Laboratory Report (Лабораторный отчет B-CLPD T1).

На первой странице лабораторного отчета представлена информация об образце и пробирке, статистика популяции и сообщения КК, при наличии.

ПРИМЕЧАНИЕ Для популяций с недостаточным числом событий строки %Parent (%Исходная) или %Grandparent (%Исходная исходной) могут отображаться со значением 0,0 %. Это происходит из-за округления результата до одного знака после запятой в программном обеспечении BD FACSuite Clinical.

3. Изучите точечные графики на 2-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 2-й странице лабораторного отчета представляют клеточный анализ высокого уровня, идентифицируя лейкоциты и лимфоциты.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопроточных заболеваниях В-клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

4. Изучите точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета используются, чтобы идентифицировать и характеризовать В-клетки в образце.

5. Изучите 4-ю страницу лабораторного отчета.

На 4-й странице лабораторного отчета представлена информация о номере партии и сроке годности гранул BD CS&T Beads и реагента BD OneFlow, настройках контрольных значений, настройках пробирок и конфигурации цитометра.

6. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Physician Report** (Отчет для лечащего врача), чтобы просмотреть отчет.

OneFlow B-CLPD T1 Physician Report (Отчет OneFlow B-CLPD T1 для лечащего врача) содержит общую сводку результатов анализа.

7. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Supplemental Report** (Дополнительный отчет), чтобы включить дополнительные точечные графики для дальнейшего анализа образца.

Дополнительную информацию см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопролиферативных заболеваниях В-клеток для проточных цитометров BD FACSLyric™*.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые области с гейтами, удаленные в этом дополнительном отчете, отражаются в лабораторном отчете и отчете для лечащего врача. Любые области с гейтами, созданные в этом дополнительном отчете, должны быть отражены в лабораторном отчете.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Не добавляйте точечные графики и гейты в лабораторный отчет или отчет для лечащего врача. Их невозможно удалить, и они сделают отчет недействительным.

-
8. Перейдите на вкладку **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).
 9. Щелкните **Approved** (Утверждено).
Откроется диалоговое окно **ESignature** (Электронная подпись).
 10. Выберите идентификационный номер пользователя.
 11. Введите пароль.
 12. Дополнительно: введите комментарии.
 13. Щелкните **Sign** (Подписать).

В поле E-signature (Электронная подпись) всех трех отчетов добавляются идентификационный номер пользователя, подписавшего отчеты, дата и время подписания, а также комментарии.

Дополнительные сведения и информацию о вариантах экспорта см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLyric™*.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva

1. В строке меню выберите **File > Import > Experiments** (Файл > Импортировать > Эксперименты).
2. Выберите эксперимент, который нужно проанализировать. Щелкните **Import** (Импортировать).
Откроется эксперимент с соответствующими рабочими листами сбора и анализа данных.
3. Выберите вкладку рабочего листа **BD OneFlow B-CLPD T1 Analysis**.
4. Изучите точечные графики на 1-й странице рабочего листа анализа данных B-CLPD T1 и отрегулируйте гейты по мере необходимости.
Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A

для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Первые три точечных графика на рабочем листе анализа данных B-CLPD T1 идентифицируют клетки, одиночные события FSC и одиночные события SSC. Клеточные обломки и слипшиеся клетки исключаются регулировкой гейтов.

Изучите популяции лейкоцитов и лимфоцитов на точечном графике CD45 V500-A против SSC-A.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток на рабочем листе анализа данных B-CLPD T1 см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопротеративных заболеваниях В-клеток*.

5. Изучите популяцию В-клеток на точечном графике CD19 PE-Cy7-A против CD20 V450-A на 2-й странице рабочего листа анализа данных B-CLPD T1 и отрегулируйте гейт по мере необходимости.

В-клетки дополнительно характеризуются по уровню экспрессии CD23, CD10, CD79b, CD200, CD43 и CD45 на оставшихся точечных графиках.

6. Изучите результаты в таблице статистики на 3-й странице рабочего листа анализа данных B-CLPD T1.

Убедитесь, что в таблице статистики присутствуют все ключевые слова. Если какие-либо ключевые слова отсутствуют, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

7. Выполните дальнейшие анализы по мере необходимости.

ПРИМЕЧАНИЕ На точечных графиках рабочего листа анализа данных B-CLPD T1 представлены гейты для анализа нормальных и аномальных клеточных популяций образца.

ПРИМЕЧАНИЕ При оценке образца пациента необходимо проанализировать файлы FCS, полученные для образца пациента, окрашенного BD OneFlow LST и BD OneFlow B-CLPD T1. Маркеры, найденные на точечных графиках BD OneFlow B-CLPD T1, используются в сочетании с CD5, CD38, Anti-Kappa и Anti-Lambda, присутствующими на точечных графиках BD OneFlow LST, чтобы отличить ХЛЛ от других хронических лимфопролиферативных заболеваний В-клеток. Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток на рабочем листе анализа данных LST см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопролиферативных заболеваниях В-клеток*.

8. Сохраните рабочий лист анализа данных B-CLPD T1 в формате PDF.

ПРИМЕЧАНИЕ Рабочий лист анализа данных B-CLPD T1 — это общий рабочий лист. При изменении гейтов в ходе анализа образца в общем рабочем листе таковые будут изменены в ранее проанализированных файлах. Сохраненные файлы PDF изменены не будут, но при возвращении к ранее проанализированному общему рабочему листу придется вернуть гейты на прежнее место.

9. (Необязательно.) Щелкните **Print** (Печать), чтобы напечатать рабочий лист анализа данных B-CLPD T1.
10. Выполните анализ следующего образца.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Использование терапевтических моноклональных антител для лечения пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.
- Использование данного реагента при диагностической оценке нарушений со стороны кроветворной системы возможно лишь в контексте тщательного иммунофенотипического анализа, включающего другие релевантные маркеры.
- Для использования BD OneFlow B-CLPD T1 необходимо обладать опытом иммунофенотипирования и классификации лейкоцитов и лимфом. Результаты должен интерпретировать патолог или аналогичный специалист с учетом других клинических и лабораторных данных.
- Эффективность реагента BD OneFlow B-CLPD T1 при тестировании образцов пациентов с минимальной остаточной болезнью (МОБ) не установлена.
- Не используйте образцы сомнительного качества, в том числе свернувшиеся, гемолизированные, замороженные и охлажденные образцы.
- Испытания работы BD OneFlow B-CLPD T1 с универсальным загрузчиком BD FACSTM Universal Loader не проводились.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Проточный цитометр BD FACSLytic

Исследования прецизионности для воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow B-CLPD T1 были выполнены в исследовательском центре BD Research Centre в Ирландии.

Воспроизводимость и повторяемость (проточный цитометр BD FACSLytic)

В одном центре проведено 5-дневное исследование воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow B-CLPD T1 с использованием контрольного материала. Оценка прецизионности проводилась между тремя проточными цитометрами BD FACSLytic тремя операторами, которые собирали данные контрольных образцов CD-Chex Plus® BC. Каждый оператор окрашивал по два контрольных образца с использованием трех партий BD OneFlow B-CLPD T1. Каждый оператор выполнял по два независимых тестирования в каждый из 5 дней оценки.

Было определено процентное содержание трех клеточных популяций, приведенных в следующих таблицах. В таблицах показано среднее значение, среднее квадратичное отклонение (SD), %CV (коэффициент вариации) и верхний 95 %-й доверительный предел (CL) воспроизводимости (воспроизводимости между операторами / между приборами и операторами / между приборами, между партиями, между тестированиями, между днями) и повторяемости (прецизионности в пределах тестирования) для каждого процентного содержания субпопуляций.

Табл. 3. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95 %-й CL SD	%CV	Верхний 95 %-й CL %CV
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	98,63	0,25	0,28	0,25	0,28
Лимфоциты (% лейкоцитов)	42,47	0,75	0,86	1,78	2,00
В-клетки (% лимфоцитов)	12,33	0,15	0,17	1,24	1,39

Табл. 4. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95 %-й CL SD	%CV	Верхний 95 %-й CL %CV
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	98,63	0,44	0,50	0,45	0,50
Лимфоциты (% лейкоцитов)	42,47	1,25	1,43	2,94	3,31
В-клетки (% лимфоцитов)	12,33	0,57	0,65	4,59	5,15

Сравнение методов (для проточных цитометров BD FACSLytic)

Было проведено сравнительное исследование использования системы BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLytic (исследуемый метод) и BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSCanto II (сравнительный метод) в 4 внешних клинических центрах. Система BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLytic включает гранулы BD CS&T Beads, семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit, BD OneFlow LST и BD OneFlow B-CLPD T1 со сбором данных на десятицветном проточном цитометре BD FACSLytic (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) с использованием программного обеспечения BD FACSuite Clinical версии 1.3[†] и анализа OneFlow B-CLPD T1. Эталонная система BD OneFlow на BD FACSCanto II включает гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads, настроенные гранулы BD OneFlow Setup Beads, восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow Assay и BD OneFlow B-CLPD T1 со сбором данных на проточном цитометре BD FACSCanto II (4-2H-2V) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva версии 8.0.2 и шаблона OneFlow

[†] Проведено исследование регрессии, продемонстрировавшее эквивалентность программного обеспечения BD FACSuite Clinical версий 1.3 и 1.4.

В-CLPD T1. Всего в исследовании использовалось 93 оцениваемых образцов периферической крови, 26 оцениваемых образцов костного мозга и 16 оцениваемых образцов лимфатических узлов. Образцы были собраны с использованием указанных антикоагулянтов. См. табл. 5.

Табл. 5. Антикоагулянты, использованные для сбора образцов

Тип образца	Антикоагулянт	
	ЭДТА	Гепарин
Периферическая кровь	68	25
Костный мозг	23	3

Для образцов периферической крови, костного мозга и лимфатических узлов первый этап промывки начался в течение 23, 24 и 23 часов после сбора соответственно. Сбор данных окрашенных образцов периферической крови, костного мозга и лимфатических узлов выполнялся в течение 58, 49 и 34 минут после окончательного ресуспензирования соответственно. Образцы с аномальными популяциями В-клеток были идентифицированы как «ХЛЛ» или «Другое В-CLPD» (включая предположительные случаи атипичного ХЛЛ) с использованием двух систем. Образцы были разделены на группы «ХЛЛ» и «Не ХЛЛ» с использованием двух систем и сопоставлены. Группа «Не ХЛЛ» включала подгруппы «Другое В-CLPD», аномальные Т, аномальные НК и «нормальные» (нормальные по показателям Т-клеток, В-клеток и НК-клеток). Кроме того, образцы были разделены на группы «Другое В-CLPD» и «Не другое В-CLPD» с использованием двух систем и сопоставлены. Группа «Не другое В-CLPD» включала подгруппы «ХЛЛ», аномальные Т, аномальные НК и «нормальные» (нормальные по показателям Т-клеток, В-клеток и НК-клеток).

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

Общий % согласованности = $((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100$

% положительной согласованности = $(a / (a + c)) \times 100$

% отрицательной согласованности = $(d / (d + b)) \times 100$

где

a = количество образцов, идентифицированных как «ХЛЛ» в обеих системах;

b = количество образцов, идентифицированных как «ХЛЛ» на проточном цитометре BD FACSLyric и идентифицированных как «Не ХЛЛ» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

c = количество образцов, идентифицированных как «Не ХЛЛ» на проточном цитометре BD FACSLyric и идентифицированных как «ХЛЛ» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

d = количество образцов, идентифицированных как «Не ХЛЛ» согласно обеим системам.

Результаты анализа образцов, идентифицированных как «ХЛЛ» или «Не ХЛЛ», были сведены в таблицу. См. табл. 6.

Табл. 6. Согласованность разделения образцов на группы «ХЛЛ» и «Не ХЛЛ»

		Сравнительный метод (проточный цитометр BD FACSCanto II)		
		ХЛЛ	Не ХЛЛ	
Исследуемый метод (проточный цитометр BD FACSLyric)	ХЛЛ	25	0	25
	Не ХЛЛ	0	110	110
	Всего	25	110	135

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95 %-й доверительный предел — 97,81 %.

Положительная согласованность для «ХЛЛ» составляет 100 %.

Отрицательная согласованность для «Не ХЛЛ» составляет 100 %.

Согласованность также была рассчитана по ранее описанным формулам, где

a = количество образцов, идентифицированных как «Другое В-CLPD» согласно обеим системам;

b = количество образцов, идентифицированных как «Другое В-CLPD» на проточном цитометре BD FACSLyric и идентифицированных как «Не другое В-CLPD» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

c = количество образцов, идентифицированных как «Не другое В-CLPD» на проточном цитометре BD FACSLyric и идентифицированных как «Другое В-CLPD» на проточном цитометре BD FACSCanto II,

d = количество образцов, идентифицированных как «Не другое В-CLPD» согласно обоим системам.

Результаты анализа образцов, идентифицированных как «Другое В-CLPD» или «Не другое В-CLPD», были сведены в таблицу. См. табл. 7.

Табл. 7. Согласованность разделения образцов на группы «Другое В-CLPD» и «Не другое В-CLPD»

		Сравнительный метод (проточный цитометр BD FACSCanto II)		Всего
		Другое В-CLPD	Не другое В-CLPD	
Исследуемый метод (проточный цитометр BD FACSLytic)	Другое В-CLPD	27	0	27
	Не другое В-CLPD	0	108	108
	Всего	27	108	135

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95 %-й доверительный предел — 97,81 %.

Положительная согласованность для «Другое В-CLPD» составляет 100 %. Отрицательная согласованность для «Не другое В-CLPD» составляет 100 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSLytic)

Качественная оценка относительной интенсивности флуоресценции (положительной либо отрицательной) или указанных маркеров в аномальных В-клетках была выполнена для каждого оцениваемого образца, участвующего в исследовании сравнения методов. Был проведен анализ образцов с использованием системы BD OneFlow

с проточным цитометром BD FACSLytic и с проточным цитометром BD FACSCanto II, как описано ранее. Была рассчитана общая согласованность двух систем с точки зрения оценки наличия или отсутствия экспрессии указанных маркеров в образцах. См. табл. 8.

Табл. 8. Согласованность для качественной экспрессии маркеров на проточных цитометрах BD FACSLytic и BD FACSCanto II

Маркер	Пробирка с реагентом BD OneFlow	% согласованности с точки зрения экспрессии маркера	Нижний 95 %-й CL % согласованности
CD5	LST	98,08	91,20
CD20	LST	100,0	94,4
CD20	B-CLPD T1	100,0	94,4
CD200	B-CLPD T1	100,0	94,4
CD23	B-CLPD T1	100,0	94,4
CD79b	B-CLPD T1	100,0	94,4
CD10	B-CLPD T1	100,0	94,4
CD43	B-CLPD T1	96,15	88,38

Результаты сравнения методов и исследований эквивалентности свидетельствуют, что эти две системы по существу эквивалентны.

Проточный цитометр BD FACSCanto II

Исследования воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow B-CLPD T1 были выполнены в лабораториях BD Biosciences в городе Сан-Хосе, штат Калифорния (США).

Воспроизводимость (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Два оператора выполняли по две независимых серии измерений в течение восьми дней на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II по очереди. Для каждой серии измерений каждым оператором выполнялось окрашивание двух образцов CD-Chex Plus® BC с использованием трех партий BD OneFlow B-CLPD T1 с последующим сбором и анализом данных при помощи шаблона OneFlow B-CLPD T1 в программном обеспечении BD FACSDiva. Было определено процентное содержание трех клеточных популяций в клеточных популяциях, приведенных в табл. 9. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций была рассчитана для всех клеточных популяций. Воспроизводимость включает четыре компонента: между оператором/прибором и оператором/прибором, между партиями, между анализами и между днями.

Табл. 9. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Популяция	Среднее значение	SD ^a	Верхний 95 %-й CL ^b SD	%CV ^c	Верхний 95 %-й CL %CV
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Лимфоциты (% лейкоцитов)	36,94	1,23	1,40	3,34	3,74
В-клетки (% лимфоцитов)	12,45	0,19	0,22	1,53	1,71

a. SD = среднееквадратичное отклонение

b. CL = доверительный предел

c. %CV = коэффициент вариации в процентах

Повторяемость (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Два оператора выполняли по две независимых серии измерений в течение восьми дней на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II по очереди. Для каждой серии измерений каждым оператором выполнялось окрашивание двух образцов CD-Chex Plus BC с использованием трех партий BD OneFlow B-CLPD T1 с последующим сбором и анализом данных при помощи шаблона OneFlow B-CLPD T1 в программном обеспечении BD FACSDiva. Было определено процентное содержание трех клеточных популяций в клеточных популяциях, приведенных в табл. 10. Прецизионность в пределах серии измерений (повторяемость между пробирками) процентного содержания субпопуляций была рассчитана для всех клеточных популяций.

Табл. 10. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Популяция	Среднее значение	SD	Верхний 95 %-й CL SD	%CV	Верхний 95 %-й CL %CV
Лейкоциты (% одиночных событий SSC)	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Лимфоциты (% лейкоцитов)	36,94	0,40	0,45	1,08	1,21
В-клетки (% лимфоцитов)	12,45	0,19	0,22	1,52	1,70

Сравнительный метод (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Было проведено сравнительное исследование работы системы BD OneFlow с проточным цитометром BD FACSCanto II и системы EuroFlow с проточным цитометром BD FACSCanto II в 4 внешних клинических центрах. Система BD OneFlow включает настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, гранулы BD FC Beads для компенсации, реагент BD OneFlow LST и реагент BD OneFlow B-CLPD T1. Эталонная система EuroFlow состоит из калибровочных

частиц Sphero™ Rainbow (8 пиков), окрашенных в один цвет клеток с гранулами BD® CompBead для компенсации и соответствующих смесей реагентов EuroFlow. В обоих методах используются гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads для контроля качества прибора. Аномальные популяции зрелых В-клеток 54 пациентов с ХЛЛ и 47 пациентов с другими заболеваниями В-клеток, в том числе предположительными случаями атипичного ХЛЛ, были идентифицированы с использованием двух систем и сопоставлены. Всего в исследовании использовалось 70 образцов периферической крови и 31 образец костного мозга. Образцы периферической крови и костного мозга были окрашены в течение 26 часов после сбора. Сбор данных всех окрашенных образцов выполнялся в течение 66 минут после окрашивания. Образцы с В-клетками, нуждающимися в дополнительных анализах, были классифицированы как образцы пациентов с ХЛЛ или другими хроническими лимфопролиферативными заболеваниями В-клеток.

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

Общий % согласованности = $((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100$

где

a = количество образцов, классифицированных как образцы пациентов с ХЛЛ в обеих системах;

b = количество образцов, классифицированных как образцы пациентов с ХЛЛ согласно системе BD OneFlow и как образцы пациентов с другими хроническими лимфопролиферативными заболеваниями В-клеток согласно системе EuroFlow;

c = количество образцов, классифицированных как образцы пациентов с другими хроническими лимфопролиферативными заболеваниями В-клеток согласно системе BD OneFlow и как образцы пациентов с ХЛЛ согласно системе EuroFlow; и

d = количество образцов, классифицированных как образцы пациентов с другими хроническими лимфопролиферативными заболеваниями В-клеток в обеих системах.

Результаты анализа образцов, классифицированных как образцы пациентов с ХЛЛ или другими хроническими лимфопролиферативными заболеваниями В-клеток, были сведены в таблицу. См. табл. 11.

Табл. 11. Согласованность разделения В-клеток, нуждающихся в дополнительных анализах, на образцы пациентов с ХЛЛ или другими хроническими лимфопролиферативными заболеваниями В-клеток

		Сравнительный метод (система EuroFlow)		Всего
		ХЛЛ	Другое заболевание В-клеток	
Исследуемый метод (система BD OneFlow)	ХЛЛ	54	0	54
	Другое заболевание В-клеток	0	47	47
	Всего	54	47	101

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95 %-й доверительный предел — 97,1 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Образцы с В-клетками CD45⁺CD19⁺, идентифицированными при помощи пробирок BD OneFlow LST как нуждающиеся в дополнительных анализах, были дополнительно охарактеризованы с точки зрения экспрессии определенных маркеров. Образцы были проанализированы при помощи системы BD OneFlow и соответствующей системы EuroFlow, описанных выше. Была рассчитана согласованность двух систем с точки зрения оценки наличия или отсутствия экспрессии указанных маркеров в аномальных В-клетках. См. табл. 12.

Табл. 12. Эквивалентность системы BD OneFlow и системы EuroFlow

Маркер	Пробирка с реагентом BD OneFlow	% согласованности с точки зрения экспрессии маркера	Нижний 95 %-й CL % согласованности
CD5	LST	98,0 %	93,9 %
CD20	LST	100,0 %	97,1 %
CD20	B-CLPD T1	100,0 %	97,1 %
CD200	B-CLPD T1	100,0 %	97,1 %
CD23	B-CLPD T1	100,0 %	97,1 %
CD79b	B-CLPD T1	99,0 %	95,4 %

Результаты сравнения методов и исследований эквивалентности свидетельствуют, что эти две системы по существу эквивалентны.

11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблемы, связанные с подготовкой или окрашиванием клеток

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Плохое лизирование образца	Приготовьте и окрасьте другой образец
	Плохое качество образца	Проверьте жизнеспособность клеток
	Образец слишком старый	Возьмите новый образец и немедленно его окрасьте
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток
	Промытый образец не был окрашен в течение 30 минут после последней промывки	Приготовьте свежий образец и повторите окрашивание
	Пробирка BD OneFlow B-CLPD T1 слишком долго была на свету	Повторите окрашивание с использованием новой пробирки BD OneFlow B-CLPD T1
	Окрашенные клетки слишком долго хранились перед сбором данных	Выполните окрашивание свежего образца и проведите сбор данных немедленно

Проблема	Возможная причина	Решение
Зарегистрировано слишком мало клеток	Концентрация клеток слишком мала	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток в образце. Если концентрация слишком низкая, увеличьте ее и повторите промывку образца. Повторите окрашивание и сбор данных
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора. Более подробно см. в руководстве по эксплуатации цитометра

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow B-CLPD T1 на проточных цитометрах BD FACSLytic

Проблема	Возможная причина	Решение
Собрано недостаточно нужных клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией. Повторите окрашивание и сбор данных
	Слишком низкое значение по умолчанию — 100 000 событий для сбора	Измените количество событий для сбора. Повторите окрашивание и сбор данных. Дополнительную информацию см. в <i>Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при хронических лимфопролиферативных заболеваниях В-клеток для проточных цитометров BD FACSLytic™</i> .
Аномальный точечный график FSC-A против SSC-A	Необходима настройка цитометра	Обратитесь в компанию BD Biosciences
Файл CSV и отчет не экспортируются автоматически	Номер партии реагента и срок годности не были вручную добавлены в библиотеку	1. Добавьте номер партии реагента и срок годности в библиотеку. 2. Экспортируйте файл CSV и PDF-отчет вручную. См. <i>Инструкции по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™</i>

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow B-CLPD T1 на проточных цитометрах BD FACSCanto II

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора. Подробнее см. в <i>Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™</i>
Некоторые точечные графики недоступны	Не выбраны FSC-H и SSC-H при создании параметров приложения	Убедитесь, что FSC-H и SSC-H выбраны на вкладке Parameters (Параметры) окна Inspector (Инспектор)
Не удается отсканировать штрихкод на этикетке пробирки BD OneFlow B-CLPD T1	Штрихкод на этикетке пробирки испорчен	Отсканируйте штрихкод на этикетке пакета с пробирками BD OneFlow B-CLPD T1 в поле Product ID (Идентификатор продукта) в разделе Experiment Layout (План эксперимента). Затем вручную введите после последней цифры штрихкода точку с запятой (;) и шестизначный код пробирки, который указан рядом со штрихкодом на этикетке пробирки
На рабочих листах отсутствуют точечные графики, или на точечных графиках отсутствуют гейты	Шаблон импортирован неправильно	1. Закройте текущий эксперимент. 2. Создайте новый эксперимент. 3. Повторно импортируйте шаблон OneFlow B-CLPD T1

Проблема	Возможная причина	Решение
Некоторые ключевые слова отсутствуют в таблице статистики на рабочем листе анализа данных	Программное обеспечение BD FACSDiva не импортировало некоторые ключевые слова в шаблон панели	1. В окне Browser (Средство просмотра) установите указатель текущей пробирки на анализируемую пробирку. 2. Перейдите на рабочий лист анализа данных. 3. Щелкните таблицу статистики правой клавишей мыши и выберите Edit Stats View (Редактировать отображение статистики). 4. На вкладке Header (Заголовок) установите флажок All (Все). 5. Нажмите OK.
Заявление For in vitro diagnostic use (Для использования в диагностике in vitro) отсутствует в нижнем колонтитуле распечатанного рабочего листа анализа данных	Изменены размеры полей листа при печати	1. В строке меню программного обеспечения BD FACSDiva выберите File > Page Setup (Файл > Параметры страницы). 2. Убедитесь, что все поля составляют 2,54 см или 1 дюйм в зависимости от стандартов по умолчанию. 3. Нажмите OK.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В СООТВЕТСТВИИ С НАСТОЯЩИМ ДОКУМЕНТОМ ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА РАСПРОСТРАНЯЮТСЯ НА ПРОДАННЫЕ ИЗДЕЛИЯ ТОЛЬКО С ЦЕЛЬЮ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И СОДЕРЖИМОГО, ЗАЯВЛЕННОГО НА ЭТИКЕТКЕ ИЛИ НА МАРКИРОВКЕ ИЗДЕЛИЯ В МОМЕНТ ДОСТАВКИ ЕГО ЗАКАЗЧИКУ. КОМПАНИЯ BD ОТКАЗЫВАЕТСЯ ОТ ВСЕХ ДРУГИХ ГАРАНТИЙ, ЯВНЫХ ИЛИ НЕЯВНЫХ, ВКЛЮЧАЯ ГАРАНТИИ ПРИГОДНОСТИ И СООТВЕТСТВИЯ ДЛЯ ЛЮБОЙ КОНКРЕТНОЙ ЦЕЛИ, А ТАКЖЕ ГАРАНТИИ НЕНАРУШЕНИЯ ПАТЕНТОВ. ИСКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ BD ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЗАМЕНОЙ ИЗДЕЛИЙ ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ПОКУПНОЙ ЦЕНЫ. КОМПАНИЯ BD НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА МАТЕРИАЛЬНЫЙ УЩЕРБ ИЛИ ЛЮБЫЕ СЛУЧАЙНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ, ВКЛЮЧАЯ ТРАВМЫ ИЛИ ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОТЕРИ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗДЕЛИЕМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized *n*-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26:1908-1975.
- 2 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26:1986-2010.
- 3 Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and Comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-43.
- 4 Sarfati M, Ishihara H, Delespesse G. CD23 Workshop Panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:530-533.
- 5 Zola H. CD10 Workshop Panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:505-507.
- 6 Engel P, Wagner N, Tedder TF. CD79 Workshop report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:667-670.
- 7 Ling NR, MacLennan ICM, Mason DY. B-cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:302-335.
- 8 Cerný J, Angelisová P, Horejší V. Non-lineage Panel—Analysis by Western blotting. In: Mason D, André P, Bensussan A, et al, eds. *Leucocyte Typing VII: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 2002:458.
- 9 Hilgert I, Drbal K. Non-lineage Panel—Analysis by cytofluorometry. In: Mason D, André P, Bensussan A, et al, eds. *Leucocyte Typing VII: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 2002:459-461.
- 10 Horejší V, Stockinger H. CD43 Workshop Panel report. In: Kishimoto H, Kikutani H, von dem Borne AEGK, et al, eds. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. New York: Garland Publishing, Inc.; 1998:494-497.
- 11 Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
- 12 Appendix C. Summary of antibody names, code numbers, and donor laboratories. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:988-993.
- 13 Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.

- 14 Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy PJ, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
- 15 Nicholson JKA, Green TA. Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping: effect of specimen age on results. *J Immunol Methods*. 1993;165:31-35.
- 16 Paxton H, Bendele T. Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann NY Acad Sci*. 1993;677:440-443.
- 17 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
- 18 Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
- 19 Davis BH, Dasgupta A, Kussick S, Han JY, Estrellado A; on behalf of ICSH/ICCS working group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part II - preanalytical issues. *Cytometry Part B* 2013;84B:286-290.
- 20 Stetler-Stevenson M, Greig B, Yuan C. Flow cytometric specimen collection, processing, and reporting. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, eds. *Laboratory Hematology Practice*. First Edition. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell Inc.; 2012:105-114.
- 21 Stetler-Stevenson M, Ahmad E, Barnett D, et al. *Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H43-A2.

ИСТОРИЯ

Редакция	Дата	Внесенные изменения
23-17203-00	12/2016	Первый выпуск
23-17203-01	7/2018	Переработано для использования CD10, клон HI10a (обновлены таблица с составом реагента, исследования прецизионности и ссылка № 5). Обновлен адрес в Новой Зеландии
23-17203-02	5/2020	Переработано для поддержки использования продукта на проточных цитометрах BD FACSLytic

BD OneFlow™ ALOT

Набор на 10 анализов — номер по
каталогу 660228

IVD

BD, логотип BD, FACSCanto, FACSDiva, FACSLytic, FACSuite, Horizon, OneFlow и Vacutainer являются товарными знаками компании Becton, Dickinson and Company или ее аффилированных компаний. Все остальные товарные знаки принадлежат соответствующим владельцам. © BD, 2020. Все права защищены.



5/2020

23-18897-01



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.53.720.600
help.biosciences@bd.com

Australian and New Zealand
Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Rd
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Ltd.
14b George Bourke Drive
Mt Wellington, Auckland, 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ	5
3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ	6
4. РЕАГЕНТ	7
Состав реагента	7
Меры предосторожности	9
Хранение и обращение	10
5. ПРИБОРЫ	11
6. ОБРАЗЦЫ	12
Интерферирующие вещества	13
7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ	13
Предоставляемые реагенты	13
Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы	13
8. ПРОЦЕДУРА	15
Установка анализа или шаблона OneFlow ALOT	15
Настройка цитометра	17
Окрашивание образца	18
Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLytic)	23
Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)	24
Сбор данных окрашенного образца	27

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical	31
Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva	34
9. ОГРАНИЧЕНИЯ	37
10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	38
Проточный цитометр BD FACSLytic	38
Проточный цитометр BD FACSCanto II	43
11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ	48
ГАРАНТИЯ	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	52
ИСТОРИЯ	53

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент BD OneFlow™ ALOT (Acute Leukemia Orientation Tube — пробирка для определения класса острого лейкоза) предназначен для проточно-цитометрического иммунофенотипирования аномальных незрелых популяций кроветворных клеток (лимфоидных и нелимфоидных клеточных линий) в костном мозге и периферической крови в качестве вспомогательного средства при диагностике острого лимфобластного лейкоза и нелимфоидного острого лейкоза. Реагент BD OneFlow ALOT предназначен для использования с соответствующим образом оснащенный проточным цитометром компании BD и программным обеспечением для диагностики *in vitro*.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Острые лейкозы — это гетерогенная группа заболеваний, которые характеризуются наличием клональной (опухолевой) популяции незрелых кроветворных клеток в периферической крови или костном мозге¹. Выделяют два основных класса острых лейкозов: лейкозы из клеток-предшественников лимфоцитов и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Лейкозы из предшественников лимфоцитов делятся на лимфобластные лейкозы из В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов (пре-В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ соответственно). Кроме того, в редких случаях опухоли не попадают ни в одну из перечисленных категорий, поскольку либо не демонстрируют явной экспрессии маркеров конкретной клеточной линии, либо экспрессируют маркеры более чем одной клеточной линии. К таким опухолям относятся острый недифференцированный лейкоз (ОНЛ) и острый лейкоз со смешанным фенотипом (ОЛСФ).

Консорциум EuroFlow™* разработал многоцветные панели антител для полного описания клеточных популяций в образце пациента при помощи иммунофенотипических маркеров, характерных для нормальных и аномальных клеток¹. В дополнение к оптимизированным многоцветным панелям антител протокол EuroFlow содержит стандартизованные процедуры настройки цитометра, определения настроек анализа, подготовки и окрашивания образца, сбора и анализа данных².

Диагностический алгоритм EuroFlow для идентификации и классификации нарушений со стороны кроветворной системы включает скрининговые панели с использованием одной пробирки и классификационные панели с использованием нескольких пробирок. Каждая пробирка содержит набор опорных маркеров и набор классификационных маркеров¹. Опорные маркеры, общие для определенного набора панелей, используются для нормализации образцов, чтобы файлы данных можно было объединять и анализировать как один большой файл данных. Это маркеры, идентифицирующие отдельные клеточные популяции в конкретной клеточной линии. Классификационные маркеры выбраны за диагностическую способность различать типы клеток в заданной клеточной линии и классифицировать аномальный тип клеток в образце.

3. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ

Многopараметрическая проточная цитометрия — чувствительный и быстрый инструмент для качественного и количественного описания клеточных популяций в образце. Клетки инкубируются с конъюгированными с флуорохромом антителами, которые связываются со своими целевыми молекулами. Окрашенные клетки затем можно

* Товарный знак и логотип EuroFlow и панели антител EuroFlow™ являются собственностью консорциума EuroFlow и не могут быть воспроизведены или опубликованы без предварительного письменного разрешения координатора EuroFlow (www.euroflow.org).

анализировать как одиночные. Многопараметрический анализ данных используется для идентификации клеточных популяций в образце пациента и может привести к идентификации аномальной клональной клеточной популяции.

Количество параметров, используемых при проточно-цитометрическом иммунофенотипировании нарушений со стороны кроветворной системы, в последние годы возросло. Реагент BD OneFlow ALOT содержит панель конъюгированных с флуорохромом антител, которые идентифицируют незрелые популяции кроветворных клеток в В-лимфоидной, Т-лимфоидной и нелимфоидных клеточных линиях. Анализ точечных графиков позволяет идентифицировать клонально экспансированные популяции незрелых кроветворных клеток-предшественников.

4. РЕАГЕНТ

Состав реагента

BD OneFlow ALOT состоит из двух одноразовых пробирок, содержащих конъюгированные с флуорохромом антитела в оптимизированной высушенной форме. Пробирка BD OneFlow ALOT S содержит антитела, которые распознают маркеры на поверхности клеток, а пробирка BD OneFlow ALOT C — антитела, которые распознают антигены в цитоплазме клеток после их фиксации и пермеабилзации. См. табл. 1.

Табл. 1. Панель антител BD OneFlow ALOT

Антитело	Пробирка	Флуорохром	Клон	Изотип
MPO	C	FITC	MPO-7 ³	IgG ₁ , κ
CD79a	C	PE	HM57 ⁴	IgG ₁ , κ
CD3	C	V450 ^a	UCHT-1 ^{5,6}	IgG ₁ , κ
CD34	S	PerCP-Cy TM 5.5 ^b	8G12 ⁷	IgG ₁ , κ
CD19	S	PE-Cy TM 7 ^b	SJ25-C1 ^{8,9}	IgG ₁ , κ

Табл. 1. Панель антител BD OneFlow ALOT

Антитело	Пробирка	Флуорохром	Клон	Изотип
CD7	S	APC	M-T701 ¹⁰	IgG ₁ , κ
CD3	S	APC-H7	SK7 ^{11,12}	IgG ₁ , κ
CD45	S	V500-C ^a	2D1 ^{5,13}	IgG ₁ , κ

a. BD Horizon™ V450, BD Horizon™ V500-C

b. Cy™ является товарным знаком компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Карнеги — Меллон (Carnegie Mellon University), изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики in vitro. Он не лицензирован ни для каких других способов применения. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта и вы не можете ее получить, верните этот продукт нераспакованным в компанию BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Антитела в пробирках BD OneFlow ALOT были выбраны за свою способность идентифицировать и характеризовать аномальные незрелые популяции кроветворных клеток.

В пробирках используются разные сочетания опорных маркеров, в зависимости от набора классификационных пробирок, который будет использован.

Для панели пре-B-ОЛЛ опорные маркеры в пробирке BD OneFlow ALOT — CD45, CD34 и CD19.

Для панели T-ОЛЛ опорные маркеры в пробирке BD OneFlow ALOT — CD45, цитоплазматический CD3 (cyCD3) и CD3.

Для панелей ОМЛ опорные маркеры в пробирке BD OneFlow ALOT — CD45 и CD34.

CD34 и отсутствие экспрессии или тусклая экспрессия CD45 (CD45^{neg/dim}) — маркеры незрелых клеток.

Цитоплазматическая миелопероксидаза (cyMPO) — маркер миелоидной клеточной линии.

cyCD3 и CD7 — маркеры Т-лимфоидной клеточной линии. CD3 используется в качестве маркера зрелости Т-лимфоцитов.

CD19 и цитоплазматический CD79a (cyCD79a) — маркеры В-лимфоидной клеточной линии.

Полное описание возможностей антител, выбранных для пробики BD OneFlow ALOT, см. в статье с описанием панелей антител EuroFlow¹.

Меры предосторожности

- Реагенты содержат от 0,25 до < 1 % 5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-она и 2-метил-4-изотиазолин-3-она (3 : 1) (номер CAS 2682-20-4) и от 0,1 до < 0,25 % азида натрия (номер CAS 26628-22-8). В Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ (СГС) эти реагенты классифицированы как опасные. Перейдите на regdocs.bd.com для загрузки паспорта безопасности вещества.

	Предупреждение
	H317: Может вызывать аллергическую кожную реакцию. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.
Предотвращение	P261: Избегать вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / вещества в распыленном состоянии. P272: Не выносить загрязненную одежду с места работы. P280: Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз/лица. P273: Не допускать попадания в окружающую среду.

	Предупреждение
Ответные меры	P302 + P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды. P333 + P313: При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу. P321: Применение специальных мер (см. паспорт безопасности материала). P363: Постирать загрязненную одежду перед последующим использованием.
Утилизация	P501: Утилизировать содержимое/контейнер на подходящем объекте по обработке и утилизации отходов в соответствии с применимыми законами, постановлениями и характеристиками продукта на момент утилизации.

Хранение и обращение

Храните пробирки при температуре 2–27 °С в пакетах из фольги. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. При соблюдении надлежащих условий хранения высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны до истечения срока годности, указанного на пакете и этикетках пробирок. Не используйте реагент после истечения срока хранения. При соблюдении надлежащих условий хранения высушенные конъюгированные с флуорохромом антитела стабильны в течение одного месяца после вскрытия пакета.

ВНИМАНИЕ! Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

5. ПРИБОРЫ

BD OneFlow ALOT предназначен для использования на следующих инструментах BD.

Табл. 2. Рекомендованные инструменты BD

Проточный цитометр	Настроечные гранулы	Настроечное программное обеспечение	Аналитическое программное обеспечение
BD FACSLytic™ ^а	Гранулы BD® CS&T Beads Семицветный комплект гранул BD® FC Beads 7-Color Kit Пятицветный комплект гранул BD® FC Beads 5-Color Kit	Программное обеспечение BD FACSuite™ Clinical версии 1.4 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии
BD FACSCanto™ II ^б	Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads Настроечные гранулы BD OneFlow™ Setup Beads Восьмицветный комплект гранул BD® FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow™	Программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии	Программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии

- а. 8-цветная конфигурация (4 синих, 2 красных, 2 фиолетовых), 10-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) или 12-цветная конфигурация (4 синих, 3 красных, 5 фиолетовых)
- б. 3-лазерная, 8-цветная оптическая конфигурация BD 4-2H-2V по умолчанию (4-2H-2V)

6. ОБРАЗЦЫ

Пробирку BD OneFlow ALOT можно использовать для проточно-цитометрического иммунофенотипирования периферической крови или аспиратов костного мозга, собранных в пробирки с ЭДТА или гепарином^{14–20} (например, в пробирки для сбора крови BD Vacutainer® blood collection tubes). Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{14–20}.

Образцы необходимо обрабатывать сразу после сбора или в течение до 24 часов после сбора в случае хранения при комнатной температуре (20–25 °C)^{17–20}. Если обработка проводится не сразу после сбора, лаборатория должна подтвердить, что образцы, которые обрабатываются и хранятся в соответствии с процедурами данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, обработанных сразу после сбора.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток¹⁴.

Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °C в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{21,22} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

Интерферирующие вещества

Не используйте образцы сомнительного качества, в том числе свернувшиеся и липемические образцы.

7. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Предоставляемые реагенты

Реагент BD OneFlow ALOT предоставляется в виде одноразовых пробирок в пакетах из фольги. В каждом наборе четыре пакета:

- два пакета, в каждом из которых по пять пробирок BD OneFlow ALOT S;
- два пакета, в каждом из которых по пять пробирок BD OneFlow ALOT C.

Необходимые, но не предоставляемые реагенты и материалы

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- BD OneFlow™ Assays Installer II (Инсталлятор II для анализов BD OneFlow™) (номер по каталогу 664226)

Для анализа OneFlow ALOT необходимо использовать инсталлятор. Анализ содержит лист сбора данных, лабораторный отчет, отчет лечащего врача и дополнительный отчет, который используется для дальнейшего обследования. Если у вас еще нет текущей версии анализа OneFlow ALOT, инсталлятор для анализов

BD OneFlow необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow ALOT.

Руководство по применению системы BD OneFlow™ при острых лейкозах для проточных цитометров BD FACSLytic™ предоставляется вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Инсталлятор шаблонов для анализов BD OneFlow™ (номер по каталогу 659305)

Для шаблона OneFlow ALOT необходимо использовать инсталлятор. Шаблон содержит два общих рабочих листа: рабочий лист OneFlow ALOT Acquisition и рабочий лист OneFlow ALOT Analysis. Если у вас еще нет текущей версии шаблона OneFlow ALOT, инсталлятор необходимо заказать при первом заказе реагента BD OneFlow ALOT. Инсталлятор также содержит шаблон OneFlow Setup и шаблоны для других реагентов BD OneFlow.

Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™ и Руководство по применению системы BD OneFlow™ при острых лейкозах поставляются вместе с инсталлятором. Руководства по применению других реагентов BD OneFlow также включены.

- Пастеровская пипетка.
- Серологическая пипетка.
- Микропипетка с наконечниками.
- Мешалка «вортекс».
- Центрифуга.
- промывочный буфер (фильтрованный фосфатный буфер (PBS) + 0,5 % альбумина бычьей сыворотки (BSA) + 0,09 % или 0,1 % азида натрия).
- Набор для фиксации и пермеабилзации клеток FIX & PERM®.

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

- Гранулы BD CS&T Beads (номер по каталогу 656504, 656505).
- Семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit (№ по каталогу 656867).
- Пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit (№ по каталогу 661564).

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

- Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD beads (номер по каталогу 656046 или 656047).
- Настрочные гранулы BD OneFlow Setup Beads (номер по каталогу 658620).
- Восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow (номер по каталогу 658621).

8. ПРОЦЕДУРА

Установка анализа или шаблона OneFlow ALOT

Анализ OneFlow ALOT, используемый с программным обеспечением BD FACSuite Clinical, или шаблон OneFlow ALOT, используемый с программным обеспечением BD FACSDiva, необходимо установить до первого запуска анализа. Одновременно с этим при необходимости можно установить дополнительные анализы или шаблоны. Если анализ файлов FCS осуществляется на отличной от использовавшейся для сбора данных образцов рабочей станции, анализы или шаблоны необходимо установить на обе рабочие станции.

Для установки анализа OneFlow в программном обеспечении BD FACSuite Clinical необходимо выполнить следующие действия.

1. Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.
Откроется мастер установки анализов BD OneFlow InstallShield.

-
- Щелкните **Next** (Далее).

Откроется лицензионное соглашение.

- Выберите вариант **I accept the terms in the license agreement** (Я принимаю условия лицензионного соглашения) и нажмите **Next** (Далее).
- Чтобы установить все анализы, имеющиеся на инсталляторе, выберите опцию **Complete** (Полная установка) и нажмите **Next** (Далее).
- Нажмите **Install** (Установить).
Анализы будут установлены в Library (Библиотека).
- Выберите **Finish** (Готово).
Мастер установки анализов InstallShield закроется.
- Необязательно: дважды щелкните ознакомительный файл (ReadMe), расположенный на инсталляторе.
Откроется ознакомительный файл (ReadMe).
- Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.
- Извлеките инсталлятор.

Для установки шаблона OneFlow в программном обеспечении BD FACSDiva необходимо выполнить следующие действия.

ПРИМЕЧАНИЕ При выборе шаблона для установки он записывается поверх шаблона с таким же именем, если таковой был установлен в системе. Если вы не хотите, чтобы имеющийся на вашем компьютере шаблон был перезаписан, не выбирайте этот шаблон в установщике в процессе установки.

- Вставьте инсталлятор и щелкните значок инсталлятора.

2. Следуйте инструкциям в диалоговом окне.

Инсталлятор скопирует и вставит шаблоны в папку
D:\BDExport\Templates\Panel\BD Panels.

ПРИМЕЧАНИЕ Если в вашей системе всего один жесткий диск, шаблоны будут установлены в папку
C:\BDExport\Templates\Panel\BD Panels.

По завершении установки откроется диалоговое окно с сообщением, какие шаблоны успешно скопированы в папку.

3. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть диалоговое окно.
4. Откроется ознакомительный файл инсталлятора (ReadMe). Закончив читать файл, нажмите кнопку закрытия окна.
5. Извлеките инсталлятор.

Настройка цитометра

Для проточных цитометров BD FACSLyric:

1. Для осуществления контроля качества определения характеристик (CQC) каждые 6 месяцев или по необходимости, ежедневного контроля качества работы (PQC), ежедневной настройки анализов и параметров пробирок используйте гранулы BD CS&T Beads и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.
2. Для обновления эталонных настроек каждые 60 дней используйте семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit и программное обеспечение BD FACSuite Clinical версии 1.4 или более поздней версии.

Обратитесь к *Инструкциям по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™* и *BD FACSLytic™ Clinical Reference System* (Справочная клиническая система BD FACSLytic™), а также документации по соответствующему реагенту для получения дополнительной информации.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для установки базового уровня цитометра и проведения ежедневных проверок работоспособности.
2. Используйте настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, лизированную промытую кровь и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной настройки напряжений фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) и детекторов светорассеяния.
3. Используйте гранулы BD FC Beads и программное обеспечение BD FACSDiva v8.0.1 или более поздней версии для ежемесячной установки компенсации флуоресценции.
4. Рекомендуется убедиться, что напряжения ФЭУ (PMTV) находятся в ежедневных целевых диапазонах.

Подробную информацию см. в *Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™* и документации по соответствующему реагенту.

Окрашивание образца

ПРИМЕЧАНИЕ Перед окрашиванием образца убедитесь, что цитометр правильно настроен.

-
1. Если пакеты хранились в холодильнике, не открывайте пакеты, пока они не нагреются до комнатной температуры.

ПРИМЕЧАНИЕ Реагент очень чувствителен к влаге. Во избежание образования конденсата открывайте пакеты, только если их температура равна комнатной.

2. Извлеките из пакета по одной пробирке BD OneFlow ALOT S для каждого образца пациента. Пробирку BD OneFlow ALOT C пока не извлекайте из пакета.
3. Поместите пробирки в штатив, защищенный от света.

Приступите к окрашиванию образца в течение часа после изъятия пробирки из пакета.

4. Немедленно закройте пакет с неиспользованными пробирками.

ПРИМЕЧАНИЕ Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

Реагент очень чувствителен к свету. Немедленно приступите к окрашиванию образца.

5. Напишите идентификатор пациента в соответствующем месте на этикетке пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Вскрыв пакет, напишите на этикетке пакета текущую дату. Используйте все пробирки из пакета в течение месяца, прежде чем вскрывать новый.

6. Десять раз переверните пробирку с образцом, чтобы как следует перемешать ее содержимое.

-
7. Добавьте в пробирку BD OneFlow ALOT S 50 мкл промывочного буфера и 50 мкл непромытого образца.

ПРИМЕЧАНИЕ Убедитесь, что весь объем образца соприкасается с реагентом на дне пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Не протирайте внешнюю поверхность пробирки этиловым или изопропиловым спиртом, чтобы не смазать напечатанную этикетку.

8. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
9. Инкубируйте в течение 30 минут при 20–25 °C в темном месте.
10. Добавьте 1,5 мл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
11. Добавьте еще 1,5 мл промывочного буфера. Аккуратно встряхните на «вортексе», чтобы перемешать содержимое.
12. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
13. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
14. Энергично встряхните на «вортексе» до полного ресуспендирования клеточного осадка.
15. Добавьте в пробирку 100 мкл фиксирующего раствора FIX & PERM Reagent A. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
16. Инкубируйте в течение 15 минут при 20–25 °C в темном месте.
17. Добавьте 1,5 мл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.

-
18. Добавьте еще 1,5 мл промывочного буфера. Аккуратно встряхните на «вортексе», чтобы перемешать содержимое.
 19. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
 20. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
 21. Энергично встряхните на «вортексе» до полного ресуспендирования клеточного осадка.

ПРИМЕЧАНИЕ Если получить суспензию отдельных клеток не удастся, ознакомьтесь с разделом «Поиск и устранение неисправностей».

22. Измерьте объем в каждой пробирке при помощи пипетки и добавьте промывочный буфер до конечного объема 100 мкл в каждой пробирке. Встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.

ПРИМЕЧАНИЕ Очень важно обеспечить конечный объем 100 мкл в каждой пробирке, чтобы все клетки были полностью пермеабиллизированы во время этапов 25–28.

23. Извлеките необходимое количество пробирок BD OneFlow ALOT C из пакета и немедленно закройте пакет.

ПРИМЕЧАНИЕ Как следует закройте пакет после извлечения пробирки. Реагент очень чувствителен к влаге. Не извлекайте осушитель из пакета с реагентом.

24. Напишите идентификатор пациента в соответствующем месте на этикетке пробирки BD OneFlow ALOT C.

ПРИМЕЧАНИЕ Вскрыв пакет, напишите на этикетке пакета текущую дату. Используйте все пробирки из пакета в течение месяца, прежде чем вскрывать новый.

25. Добавьте 100 мкл пермеабиллизующего раствора FIX & PERM Reagent B в пробирку BD OneFlow ALOT C.

-
26. Перенесите 100 мкл образца из пробирки BD OneFlow ALOT S в соответствующую пробирку BD OneFlow ALOT C.

ПРИМЕЧАНИЕ Номера идентификаторов пациента на обеих пробирках должны совпадать.

27. Энергично встряхните на «вортексе» пробирку BD OneFlow ALOT C в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
28. Инкубируйте в течение 15 минут при 20–25 °C в темном месте.
29. Добавьте 1,5 мл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы как следует перемешать содержимое.
30. Добавьте еще 1,5 мл промывочного буфера. Аккуратно встряхните на «вортексе», чтобы перемешать содержимое.
31. Центрифугируйте при 540 g в течение 5 минут при 20–25 °C.
32. Уберите надосадочную жидкость, не потревожив клеточный осадок, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости.
33. Добавьте в пробирку 200 мкл промывочного буфера. Энергично встряхните на «вортексе» в течение 3–5 секунд, чтобы полностью ресуспендировать клеточный осадок.

ПРИМЕЧАНИЕ Сбор данных образцов необходимо проводить сразу после окрашивания или в течение 1 часа, если образцы хранятся при температуре 2–8 °C в защищенном от света месте. Если сбор данных проводится не сразу после окрашивания, лаборатория должна подтвердить, что окрашенные образцы, которые до сбора данных хранились при условиях хранения данной лаборатории, дают результаты, эквивалентные результатам образцов, сбор данных которых был проведен сразу после окрашивания. Окрашенные образцы до сбора данных необходимо держать в темном месте.

Настройка анализа (проточный цитометр BD FACSLytic)

Добавьте идентификатор партии реагента и срок годности в библиотеку следующим образом.

1. На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок Library (Библиотека).

Откроется рабочая область Library (Библиотека).

2. Откройте меню **Beads and Reagents** (Гранулы и реагенты) и выберите **Reagents** (Реагенты).

3. В списке **Product Name** (Наименование изделия) выберите OneFlow ALOT.

В нижней части страницы появится панель **OneFlow ALOT**.

4. Щелкните **Add Lot** (Добавить партию).

Откроется диалоговое окно **Add New Lot** (Добавить новую партию).

5. Вручную введите **Lot ID** (Идентификатор партии), указанный на этикетке пробирки.

6. Нажмите на значок календаря и выберите на календаре дату истечения срока годности, указанную на этикетке пробирки.

7. Установите флажок **Current Lot** (Текущая партия).

8. Нажмите **ОК**.

Идентификатор партии и срок годности будут добавлены в соответствующие поля сведений о реагенте.

ПРИМЕЧАНИЕ Убедитесь, что идентификатор партии реагента и срок годности добавлены в сведения о реагенте до начала сбора данных образцов. Эту процедуру необходимо выполнить только один раз для одной партии реагентов.

Порядок создания рабочей процедуры:

1. На панели навигации программного обеспечения BD FACSuite Clinical нажмите на значок Worklists (Рабочие процедуры).
Откроется рабочая область Worklists (Рабочие процедуры).
2. На вкладке **Manage Worklists** (Управление рабочими процедурами) нажмите кнопку **New** (Новая).
В новой вкладке откроется пустая рабочая процедура.
3. В разделе **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры) выберите в меню **Task** (Задача) нужную задачу.
4. Для задач, связанных с реагентами OneFlow, введите **Sample ID** (Идентификатор образца) вручную.

Не сканируйте штрихкод на этикетке пробирки в программное обеспечение.

ПРИМЕЧАНИЕ Разные партии одного реагента нельзя использовать в рамках одной рабочей процедуры.

5. В разделе **Loading Options** (Параметры загрузки) выберите **Manual** (Вручную) в меню **Loading Option** (Параметры загрузки).

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Настройка эксперимента (проточный цитометр BD FACSCanto II)

1. В строке меню выберите **Edit > User Preferences** (Редактировать > Настройки пользователя), перейдите на вкладку **FCS** и выберите **Export FCS after recording** (Экспорт FCS после записи) для автоматического экспорта файлов FCS после сбора данных. Нажмите **OK**.
2. Убедитесь, что выбрана конфигурация цитометра BD по умолчанию 4-2H-2V.

3. В строке меню выберите **Experiment > New Experiment > Blank Experiment** (Эксперимент > Новый эксперимент > Пустой эксперимент). Нажмите **ОК**.

ПРИМЕЧАНИЕ Также эксперимент можно создать непосредственно из окна **Browser** (Средство просмотра), щелкнув значок **Experiment** (Эксперимент).

4. Если отображается диалоговое окно **CST Mismatch** (Несовпадение CST), выберите **Use CST Settings** (Использовать параметры CST).
5. Переименуйте эксперимент в соответствии с правилами лаборатории.
6. В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Link Setup** (Настройки цитометра > Привязать настройки) и выберите соответствующую матрицу компенсации, рассчитанную с использованием гранул BD FC Beads в течение последних 31 суток. Щелкните **Link** (Привязать).

См. инструкцию по эксплуатации восьмицветного комплекта гранул *BD® FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow™* или *Руководство по настройке прибора для анализов BD OneFlow™*.

7. Если отображается диалоговое окно **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), выберите **Overwrite** (Перезаписать).
8. Щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Unlink From** (Настройки цитометра > Отменить связь с) и выберите ранее привязанную настройку компенсации. Нажмите **ОК**.

ПРИМЕЧАНИЕ Отмена связи с настройкой компенсации позволяет применить обновленные параметры приложения, сохранив значения компенсации.

-
9. В окне **Browser** (Средство просмотра) щелкните правой клавишей мыши **Cytometer Settings > Application Settings > Apply** (Настройки цитометра > Параметры приложения > Применить) и выберите самые последние параметры приложения, определенные за последние 31 сутки с использованием настроечных гранул BD OneFlow Setup Beads. Щелкните **Apply** (Применить).
 10. Откроется диалоговое окно **Confirm** (Подтвердить). Выберите **Keep the compensation value** (Сохранить значение компенсации).
 11. При появлении диалогового окна **Confirm Cytometer Changes** (Подтвердить изменения настроек цитометра) щелкните **Yes** (Да), чтобы перезаписать значения настроек цитометра для **FSC Area Scaling** (Масштабирование области FSC).
 12. В строке меню выберите **Experiment > New Specimen** (Эксперимент > Новый образец).
Откроется диалоговое окно **Panel Templates** (Шаблоны панели).
 13. Перейдите на вкладку **BD Panels** (Панели BD) и выберите шаблон OneFlow ALOT.
 14. Укажите количество образцов пациентов, для которых необходимо выполнить сбор данных, в поле **Copies** (Копии) внизу вкладки **BD Panels** (Панели BD). Нажмите **OK**.
 15. Переименуйте образцы, например укажите соответствующие идентификаторы пациента перед названиями образцов.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости повторить запуск конкретного образца пациента установите указатель текущей пробирки на пробирку, запуск которой нужно повторить. Нажмите кнопку **Next Tube** (Следующая пробирка) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы создать еще одну пробирку для этого пациента. Не используйте для создания дополнительной пробирки пункт меню **Experiment > New Tube** (Эксперимент > Новая пробирка) или значок **New Tube**

(Новая пробирка) в строке меню **Browser** (Средство просмотра), поскольку в таком случае поля этикеток и штрихкода заполнены не будут.

ПРИМЕЧАНИЕ При необходимости выполнить сбор данных для других образцов пациентов в данном эксперименте повторите шаги 12–15, чтобы добавить новые образцы. Откроются два диалоговых окна **Confirm** (Подтвердить) с вопросами, хотите ли вы создать еще один рабочий лист сбора данных ALOT или рабочий лист анализа данных ALOT. Нажмите **Cancel** (Отмена) в каждом диалоговом окне.

16. В строке меню выберите **Experiment > Experiment Layout** (Эксперимент > План эксперимента) и перейдите на вкладку **Keywords** (Ключевые слова).
17. Выделите ключевое слово **Product ID** (Идентификатор продукта) для соответствующей пробирки и отсканируйте штрихкод на этикетке пробирки BD OneFlow ALOT (C).

ПРИМЕЧАНИЕ Если отсканировать штрихкод на этикетке пробирки не удастся, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

18. Вручную добавьте необходимую информацию в оставшиеся ключевые слова.
19. Нажмите **ОК**, чтобы закрыть **Experiment Layout** (План эксперимента).

Сбор данных окрашенного образца

Для проточных цитометров BD FACSLytic:

Анализ автоматически соберет 100 000 событий. После начала сбора данных невозможно изменить количество событий. Поэтому, если необходимо изменить количество событий, сделайте это до начала сбора данных. Инструкции по изменению количества событий для

сбора см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при острых лейкозах для проточных цитометров BD FACSLytic™*. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

Чтобы собрать данные образца, выполните следующие действия.

1. Нажмите **Run All** (Выполнить все) в меню **Run** (Выполнить) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы выполнить рабочую процедуру с самого начала.

Либо, чтобы собрать данные для конкретной пробирки, наведите указатель выполнения на образец, для которого необходимо выполнить сбор, и нажмите **Run from Pointer** (Выполнить, начиная с положения указателя) в меню **Run** (Выполнить).

2. Встряхните каждую пробирку на «вортексе» в течение 3–5 секунд на низкой скорости непосредственно перед сбором данных пробирки.
3. Следуйте подсказкам в программном обеспечении, чтобы загрузить или извлечь пробирки.

Откроется рабочий лист сбора данных OneFlow ALOT Acquisition. Рабочий лист сбора данных содержит точечные графики и гейты, позволяющие идентифицировать клетки, лейкоциты и CD45^{neg}/dim.

4. Исследуйте каждый точечный график на рабочем листе сбора данных.

ПРИМЕЧАНИЕ Время предварительного просмотра составляет 10 секунд, затем данные записываются автоматически. Не увеличивайте время предварительного просмотра и не используйте недостаточный объем образца во избежание риска его потери.

-
5. Если предполагается собрать менее 100 000 событий, отслеживайте объем образца и нажмите **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор данных до опустошения пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Анализ автоматически соберет 100 000 событий. Если это невозможно, сбор прекращается по истечении 5 минут. Однако необходимо отслеживать объем образцов и нажать **Stop Tube** (Остановить пробирку) в строке **Worklist Controls** (Управления рабочей процедурой), чтобы остановить сбор до опустошения пробирки. Инструкции по изменению критериев остановки см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при острых лейкозах для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

Дополнительные сведения см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™*.

Для проточных цитометров BD FACSCanto II:

1. В окне **Browser** (Средство просмотра) разверните соответствующий образец и установите указатель текущей пробирки на нужную.
2. Выберите вкладку рабочего листа **BD OneFlow ALOT Acquisition**.
3. Встряхните окрашенную пробирку в течение 3–5 секунд на низкой скорости.
4. Установите пробирку в цитометр. Установите скорость потока на **Medium** (Средняя) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных). Щелкните **Acquire Data** (Сбор данных).
5. Убедитесь, что популяция охвачена шкалой, и отрегулируйте гейт на первом графике рабочего листа сбора данных ALOT, чтобы исключить клеточные обломки, если необходимо.

- Щелкните **Record Data** (Регистрировать данные) в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы собрать нужное количество событий.

ПРИМЕЧАНИЕ Шаблон автоматически собирает 100 000 событий². При необходимости используйте меню в окне **Acquisition Dashboard** (Панель управления сбором данных), чтобы выбрать другое количество событий для сбора. Клинически значимое количество клеток определяется на усмотрение медицинского специалиста.

- Изучите точечные графики на рабочем листе сбора данных ALOT и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Для идентификации клеток используется точечный график FSC-A против SSC-A.

Для идентификации лейкоцитов используется точечный график CD45 V500-A против SSC-A, показывающий популяцию Cells (клетки).

Для идентификации популяции CD45^{neg/dim} используется точечный график CD45 V500-A против SSC-A, показывающий популяцию Leukocytes (лейкоциты).

Оставшиеся точечные графики гейтов не содержат и включены для оценки качества окрашивания популяции CD45^{neg/dim} всеми антителами, то есть внутреннего контроля качества окрашивания пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток на рабочем листе сбора данных ALOT см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при острых лейкозах*.

8. Продолжайте, пока не будет завершен сбор данных по всем пробиркам.
9. В строке меню выберите **File > Export > Experiments** (Файл > Экспортировать > Эксперименты) и выберите параметр **Directory Export** (Экспортировать каталог). Нажмите **ОК**.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSuite Clinical

1. Наведите указатель выполнения на соответствующий образец на панели **Worklist Entries** (Записи рабочей процедуры).

OneFlow ALOT Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow ALOT) откроется во вкладке **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).

2. Ознакомьтесь с OneFlow ALOT Laboratory Report (Лабораторный отчет OneFlow ALOT).

На первой странице лабораторного отчета представлена информация об образце и пробирке, статистика популяции и сообщения КК, при наличии.

ПРИМЕЧАНИЕ Для популяций с недостаточным числом событий строки %Parent (%Исходная) или %Grandparent (%Исходная исходной) могут отображаться со значением 0,0 %. Это происходит из-за округления результата до одного знака после запятой в программном обеспечении BD FACSuite Clinical.

-
3. Изучите точечные графики на 2-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 2-й странице лабораторного отчета представляют клеточный анализ высокого уровня, идентифицируя клетки, одиночные события FSC, одиночные события SSC, лейкоциты и клетки CD45^{neg/dim}.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересные популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при острых лейкозах для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

4. Изучите точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 3-й странице лабораторного отчета используются, чтобы идентифицировать и анализировать Т-клетки и В-клетки в образце.

5. Изучите точечные графики на 4-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 4-й странице лабораторного отчета используются, чтобы идентифицировать и анализировать нелимфоидные клетки в образце.

6. Изучите точечные графики на 5-й странице лабораторного отчета и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Точечные графики на 5-й странице лабораторного отчета используются, чтобы идентифицировать и анализировать клетки CD45^{neg/dim} в образце.

7. Изучите 6-ю страницу лабораторного отчета.

На 6-й странице лабораторного отчета представлена информация о номере партии и сроке годности гранул BD CS&T Beads и реагента BD OneFlow, настройках контрольных значений, настройках пробирок и конфигурации цитометра.

8. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Physician Report** (Отчет для лечащего врача), чтобы просмотреть отчет.

OneFlow ALOT Physician Report (Отчет OneFlow ALOT для лечащего врача) содержит общую сводку результатов анализа.

9. (Дополнительно) Щелкните вкладку **Supplemental Report** (Дополнительный отчет), чтобы включить дополнительные точечные графики для дальнейшего анализа образца.

Дополнительную информацию см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при острых лейкозах для проточных цитометров BD FACSLytic™*.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые области с гейтами, удаленные в этом дополнительном отчете, отражаются в лабораторном отчете и отчете для лечащего врача. Любые области с гейтами, созданные в этом дополнительном отчете, должны быть отражены в лабораторном отчете.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Не добавляйте точечные графики и гейты в лабораторный отчет или отчет для лечащего врача. Их невозможно удалить, и они сделают отчет недействительным.

10. Перейдите на вкладку **Laboratory Report** (Лабораторный отчет).
11. Щелкните **Approved** (Утверждено).
Откроется диалоговое окно **ESignature** (Электронная подпись).
12. Выберите идентификационный номер пользователя.
13. Введите пароль.

14. Дополнительно: введите комментарии.

15. Щелкните **Sign** (Подписать).

В поле E-signature (Электронная подпись) всех трех отчетов добавляются идентификационный номер пользователя, подписавшего отчеты, дата и время подписания, а также комментарии.

Дополнительные сведения и информацию о вариантах экспорта см. в *Инструкциях по эксплуатации клинической системы BD FACSLyric™*.

Анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva

1. В строке меню выберите **File > Import > Experiments** (Файл > Импортировать > Эксперименты).

2. Выберите эксперимент, который нужно проанализировать. Щелкните **Import** (Импортировать).

Откроется эксперимент с соответствующими рабочими листами сбора и анализа данных.

3. Выберите вкладку рабочего листа **BD OneFlow ALOT Analysis**.

4. Изучите точечные графики на 1-й странице рабочего листа анализа данных ALOT и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Некоторые точечные графики могут отличаться в разных экспериментах. Исходный точечный график FSC-A против SSC-A для идентификации клеток и исключения клеточных обломков может выглядеть сжатым. Это вызвано целевыми значениями, использованными для создания параметров приложения. Данные значения определены консорциумом EuroFlow.

ПРИМЕЧАНИЕ Увеличьте точечные графики для редактирования гейтов, чтобы было легче видеть интересующие

популяции. После регулировки гейтов сверните точечный график до исходного размера.

Первые три точечных графика на 1-й странице рабочего листа анализа данных ALOT идентифицируют клетки, одиночные события FSC и одиночные события SSC. Клеточные обломки и слипшиеся клетки исключаются регулировкой гейтов.

Изучите популяцию Leukocytes на точечном графике CD45 V500-A против SSC-A на основе гейта SSC Singlets.

Изучите популяцию CD45^{neg/dim} на точечном графике CD45 V500-A против SSC-A на основе гейта Leukocytes.

На точечном графике CD34 PerCP-Cy5.5-A против SSC-A гейта нет; он используется в информационных целях.

ПРИМЕЧАНИЕ Примеры точечных графиков с популяциями нормальных клеток на рабочем листе анализа данных ALOT см. в *Руководстве по применению системы BD OneFlow™ при острых лейкозах*.

5. Изучите точечные графики, идентифицирующие Т-лимфоциты, в верхней половине 2-й страницы рабочего листа анализа данных ALOT и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Клетки, экспрессирующие цитоплазматический CD3 (cyCD3⁺), идентифицируются на точечном графике cyCD3 V450-A против SSC-A на основе популяции Leukocytes.

Т-клетки идентифицируются на точечном графике CD3 APC-H7-A против cyCD3 V450-A на основе популяции cyCD3⁺. Клетки cyCD3⁺ характеризуются на оставшихся точечных графиках.

6. Изучите точечные графики, идентифицирующие В-лимфоциты, в нижней половине 2-й страницы рабочего листа анализа данных ALOT и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Клетки CD19⁺ идентифицируются на точечном графике CD19 PE-Cy7-A против SSC-A на основе популяции Leukocytes.

В-клетки идентифицируются на точечном графике cyCD79a PE-A против CD19 PE-Cy7-A на основе популяции CD19⁺. Клетки CD19⁺ характеризуются на оставшихся точечных графиках.

7. Изучите точечные графики, идентифицирующие нелимфоидные клетки, на 3-й странице рабочего листа анализа данных ALOT и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Нелимфоидные клетки идентифицируются на точечном графике CD45 V500-A против SSC-A на основе популяции NOT(cyCD3⁺ OR CD19⁺).

Клетки, экспрессирующие цитоплазматическую миелопероксидазу (суMPO⁺), идентифицируются на точечном графике суMPO FITC-A против SSC-A на основе популяции Non-Lymphoid. Нелимфоидные клетки характеризуются на оставшихся точечных графиках.

8. Изучите точечные графики, идентифицирующие клетки CD45^{neg/dim}, на 4-й странице рабочего листа анализа данных ALOT и отрегулируйте гейты по мере необходимости.

Клетки CD45^{neg/dim} идентифицируются на точечном графике CD45 V500-A против SSC-A на основе популяции Leukocytes.

Клетки CD45^{neg/dim}CD34⁺ идентифицируются на точечном графике CD34 PerCP-Cy5.5-A против SSC-A на основе популяции CD45^{neg/dim}.

Оставшиеся точечные графики демонстрируют экспрессию каждого маркера в сочетании с CD34 для популяции CD45^{neg/dim}.

9. Изучите результаты в таблице статистики на стр. 5 рабочего листа анализа данных ALOT.

Убедитесь, что в таблице статистики присутствуют все ключевые слова. Если какие-либо ключевые слова отсутствуют, см. раздел «Поиск и устранение неисправностей».

10. Выполните дальнейшие анализы по мере необходимости.

ПРИМЕЧАНИЕ На точечных графиках рабочего листа анализа данных ALOT представлены гейты для анализа нормальных и аномальных клеточных популяций образца. Аномальные клеточные популяции требуют дальнейшего анализа.

11. Сохраните рабочий лист анализа данных ALOT в формате PDF.

ПРИМЕЧАНИЕ Рабочий лист анализа данных ALOT — это общий рабочий лист. При изменении гейтов в ходе анализа образца в общем рабочем листе таковые будут изменены в ранее проанализированных файлах. Сохраненные файлы PDF изменены не будут, но при возвращении к ранее проанализированному общему рабочему листу придется вернуть гейты на прежнее место.

12. (Необязательно.) Щелкните **Print** (Печать), чтобы напечатать рабочий лист анализа данных ALOT.
13. Выполните анализ следующего образца.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Использование терапевтических моноклональных антител для лечения пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

- Использование данного реагента при диагностической оценке нарушений со стороны кроветворной системы возможно лишь в контексте тщательного иммунофенотипического анализа, включающего другие релевантные маркеры, например маркеры, присутствующие в классификационных панелях EuroFlow, и другие диагностические тесты.
- Для использования BD OneFlow ALOT необходимо обладать опытом иммунофенотипирования и классификации лейкоцитов и лимфоцитов. Результаты должен интерпретировать патолог или аналогичный специалист с учетом других клинических и лабораторных данных.
- Эффективность реагента BD OneFlow ALOT при тестировании образцов пациентов с минимальной остаточной болезнью (МОБ) не установлена.
- Не используйте образцы сомнительного качества, в том числе свернувшиеся, гемолизированные, замороженные и охлажденные образцы.
- Не используйте липемические образцы.
- Испытания работы BD OneFlow ALOT с универсальным загрузчиком BD FACSTM Universal Loader не проводились.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Проточный цитометр BD FACSLytic

Исследования прецизионности для воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow ALOT были выполнены в исследовательском центре BD Research Centre в Ирландии.

Воспроизводимость и повторяемость (проточный цитометр BD FACSLytic)

В одном центре проведено 5-дневное исследование воспроизводимости и повторяемости BD OneFlow ALOT с использованием контрольного материала. Оценка прецизионности проводилась между тремя проточными цитометрами BD FACSLytic тремя операторами, которые

собирали данные контрольных образцов CD-Chex CD34® уровня 3. Каждый оператор окрашивал по два контрольных образца с использованием трех партий BD OneFlow ALOT. Каждый оператор выполнял по два независимых тестирования в каждый из 5 дней оценки.

Было определено процентное содержание трех клеточных популяций, приведенных в следующих таблицах. В таблицах показано среднее значение, среднеквадратичное отклонение (SD), %CV (коэффициент вариации) и верхний 95%-й доверительный предел (CL) воспроизводимости (воспроизводимости между операторами / между приборами и операторами / между приборами, между партиями, между тестированиями, между днями) и повторяемости (прецизионности в пределах тестирования) для каждого процентного содержания субпопуляций.

Табл. 3. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
В-клетки (% лейкоцитов)	4,30	0,51	0,58	11,80	13,28
Т-клетки (% лейкоцитов)	25,17	2,26	2,59	9,00	10,12
Клетки суМРО ⁺ (% лейкоцитов)	52,74	1,23	1,41	2,34	2,63

Табл. 4. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
В-клетки (% лейкоцитов)	4,30	0,14	0,16	3,28	3,68

Табл. 4. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Субпопуляция	Среднее значение	SD	Верхний 95%-й CL SD	%CV	Верхний 95%-й CL %CV
Т-клетки (% лейкоцитов)	25,17	0,48	0,55	1,92	2,16
Клетки суМРО ⁺ (% лейкоцитов)	52,74	0,56	0,64	1,06	1,19

Сравнение методов (для проточных цитометров BD FACSLytic)

Было проведено сравнительное исследование использования системы BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLytic (исследуемый метод) и BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSCanto II (сравнительный метод) в 3 клинических центрах. Система BD OneFlow на проточном цитометре BD FACSLytic включает гранулы BD CS&T Beads, семицветный комплект гранул BD FC Beads 7-Color Kit, пятицветный комплект гранул BD FC Beads 5-Color Kit и BD OneFlow ALOT со сбором данных на десятицветном проточном цитометре BD FACSLytic (4 синих, 3 красных, 3 фиолетовых) с использованием программного обеспечения BD FACSuite Clinical версии 1.3[†] и анализа OneFlow ALOT. Эталонная система BD OneFlow на BD FACSCanto II включает гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads, настроечные гранулы BD OneFlow Setup Beads, восьмицветный комплект гранул BD FC Beads 8-Color Kit для анализов BD OneFlow Assay и BD OneFlow ALOT со сбором данных на проточном цитометре BD FACSCanto II (4-2H-2V) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva версии 8.0.2 и шаблона OneFlow ALOT. Всего в исследовании использовалось 26 оцениваемых образцов периферической крови и 28 оцениваемых образцов костного мозга. Образцы были собраны с использованием указанных антикоагулянтов. См. табл. 5.

[†] Проведено исследование регрессии, продемонстрировавшее эквивалентность программного обеспечения BD FACSuite Clinical версий 1.3 и 1.4.

Табл. 5. Антикоагулянты, использованные для сбора образцов

Тип образца	Антикоагулянт	
	ЭДТА	Гепарин
Периферическая кровь (лимфоидные)	12	2
Периферическая кровь (нелимфоидные)	10	1
Периферическая кровь (острый лейкоз со смешанным фенотипом)	1	0
Периферическая кровь (всего)	23	3
Костный мозг (лимфоидные)	7	0
Костный мозг (нелимфоидные)	21	0
Костный мозг (всего)	28	0

Все образцы в исследовании были окрашены в течение 23 часов после сбора. Сбор данных всех окрашенных образцов выполнялся в течение 33 минут после окончательного ресуспензирования. Образцы, в которых присутствовали популяции аномальных незрелых кроветворных клеток, были идентифицированы как нелимфоидные или лимфоидные с использованием двух систем и сопоставлены. Среди образцов, идентифицированных как нелимфоидные, были образцы с ОНЛ. Среди образцов, идентифицированных как лимфоидные, было 19 образцов В-лимфоидной клеточной линии и 2 образцов Т-лимфоидной клеточной линии.

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

Общий % согласованности = $((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100$

% положительной согласованности = $(a / (a + c)) \times 100$

% отрицательной согласованности = $(d / (d + b)) \times 100$

где

a = количество образцов, идентифицированных как нелимфоидные согласно обеим системам;

b = количество образцов, идентифицированных как нелимфоидные на проточном цитометре BD FACSLytic и идентифицированных как лимфоидные на проточном цитометре BD FACSCanto II,

c = количество образцов, идентифицированных как лимфоидные на проточном цитометре BD FACSLytic и идентифицированных как нелимфоидные на проточном цитометре BD FACSCanto II,

d = количество образцов, идентифицированных как лимфоидные согласно обеим системам.

Результаты анализа образцов, идентифицированных как лимфоидные или нелимфоидные, были сведены в таблицу. Один оцениваемый образец был исключен из таблицы, поскольку в нем обнаружен острый лейкоз со смешанным фенотипом. См. табл. 6.

Табл. 6. Согласованность идентификации аномальных незрелых кроветворных клеток как лимфоидных или нелимфоидных

		Сравнительный метод (проточный цитометр BD FACSCanto II)		
		Нелимфоидные	Лимфоидные	
Исследуемый метод (проточный цитометр BD FACSLytic)	Нелимфоидные	32	0	32
	Лимфоидные	0	21	21
	Всего	32	21	53

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 95,75 %.

Положительная согласованность среди образцов, идентифицированных как нелимфоидные, составляла 100 %. Отрицательная согласованность среди образцов, идентифицированных как лимфоидные, составляла 100 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSLytic)

Для каждого оцениваемого образца, участвующего в исследовании сравнения методов, была выполнена качественная оценка клеточных популяций на наличие или отсутствие ключевых маркеров BD OneFlow ALOT. Был проведен анализ образцов с использованием системы

BD OneFlow с проточным цитометром BD FACSLytic и с проточным цитометром BD FACSCanto II, как описано ранее. Была рассчитана общая согласованность двух систем с точки зрения оценки наличия или отсутствия экспрессии указанных маркеров в образцах. См. табл. 7.

Табл. 7. Согласованность для качественной экспрессии маркеров на проточных цитометрах BD FACSLytic и BD FACSCanto II

Маркер	Количество образцов	Общий % согласованности с точки зрения экспрессии маркера	Нижний 95%-й CL общего % согласованности
CD45 ^{neg} /dim	54	100 %	95,83 %
CD45 ^{neg} /dim и cyCD3 ⁺	54	100 %	95,83 %
CD45 ^{neg} /dim и CD3 ⁺	54	100 %	95,83 %
CD45 ^{neg} /dim и CD19 ⁺	54	100 %	95,83 %
CD45 ^{neg} /dim и cyCD79a ⁺	54	100 %	95,83 %
CD45 ^{neg} /dim и cyMPO ⁺	54	100 %	95,83 %
CD45 ^{neg} /dim и CD7 ⁺	54	100 %	95,83 %
CD45 ^{neg} /dim и CD34 ⁺	54	100 %	95,83 %

Результаты сравнения методов и исследований эквивалентности свидетельствуют, что эти две системы по существу эквивалентны.

Проточный цитометр BD FACSCanto II

Прецизионность (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Исследования воспроизводимости и повторяемости анализов с использованием реагента BD OneFlow ALOT были выполнены в лабораториях компании BD Biosciences в городе Сан-Хосе, штат Калифорния (США).

Два оператора выполняли по два независимых запуска в день на одном из двух проточных цитометров BD FACSCanto II. Операторы менялись приборами каждый день в течение восьми дней. В каждом тестировании каждым оператором выполнялось окрашивание CD-Chex CD34® в дубликатах с использованием трех партий BD OneFlow ALOT с последующим сбором и анализом данных с помощью шаблона OneFlow ALOT в программном обеспечении BD FACSDiva.

Воспроизводимость

Было определено процентное содержание трех клеточных популяций как процент от клеточных популяций, указанных в табл. 8.

Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций была рассчитана для всех клеточных популяций. Воспроизводимость включает четыре компонента: между оператором/прибором и оператором/прибором, между партиями, между анализами и между днями.

Табл. 8. Воспроизводимость процентного содержания субпопуляций

Популяция	Среднее значение	SD ^a	Верхний 95%-й CL ^b SD	%CV ^c	Верхний 95%-й CL %CV
Т-клетки (% лейкоцитов)	29,0	0,2	0,6	0,7	1,9
В-клетки (% лейкоцитов)	5,7	0,1	0,6	2,3	10,0
Клетки суМРО ⁺ (% лейкоцитов)	54,8	1,1	4,8	2,0	8,8

a. SD = среднееквадратичное отклонение

b. CL = доверительный предел

c. %CV = коэффициент вариации в процентах

Повторяемость

Было определено процентное содержание трех клеточных популяций в клеточных популяциях, приведенных в табл. 9. Прецизионность в пределах серии измерений (повторяемость между пробирками) процентного содержания субпопуляций была рассчитана для всех клеточных популяций.

Табл. 9. Повторяемость процентного содержания субпопуляций

Популяция	Среднее значение	SD	Верхний 95 %-й CL SD	%CV	Верхний 95 %-й CL %CV
Т-клетки (% лейкоцитов)	29,0	0,5	0,5	1,7	1,9
В-клетки (% лейкоцитов)	5,7	0,1	0,2	2,5	2,8
Клетки суМРО ⁺ (% лейкоцитов)	54,8	0,8	0,9	1,4	1,6

Сравнительный метод (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Было проведено сравнительное исследование работы системы BD OneFlow с проточным цитометром BD FACSCanto II и системы EuroFlow с проточным цитометром BD FACSCanto II в 5 внешних клинических центрах. Система BD OneFlow включает настроенные гранулы BD OneFlow Setup Beads, гранулы BD FC Beads для компенсации и реагент BD OneFlow ALOT. Эталонная система EuroFlow состоит из калибровочных частиц Sphero™ Rainbow (8 пиков), окрашенных в один цвет клеток для компенсации и соответствующих смесей реагентов EuroFlow. В обоих методах используются гранулы BD FACSDiva CS&T IVD beads для контроля качества прибора. Аномальные незрелые популяции кроветворных клеток 93 пациентов были идентифицированы с использованием двух

систем и сопоставлены. Всего в исследовании использовалось 37 образцов периферической крови и 56 образец костного мозга. Образцы периферической крови и костного мозга были окрашены в течение 24 часов после сбора. Сбор данных окрашенных образцов выполнялся в течение 45 минут после окрашивания. Образцы, в которых присутствовали популяции незрелых кроветворных клеток, были идентифицированы как нелимфоидные или лимфоидные. Среди образцов, идентифицированных как нелимфоидные, были образцы с ОНЛ. Среди образцов, идентифицированных как лимфоидные, было 37 образцов В-лимфоидной клеточной линии и 7 образцов Т-лимфоидной клеточной линии.

Согласованность была рассчитана по следующей формуле:

$$\text{Общий \% согласованности} = ((a + d) / (a + b + c + d)) \times 100,$$

где

a = количество образцов, идентифицированных как нелимфоидные согласно обеим системам;

b = количество образцов, классифицированных как нелимфоидные согласно системе BD OneFlow и как лимфоидные согласно системе EuroFlow;

c = количество образцов, классифицированных как лимфоидные согласно системе BD OneFlow и как нелимфоидные согласно системе EuroFlow;

d = количество образцов, идентифицированных как лимфоидные согласно обеим системам.

Результаты анализа образцов, идентифицированных как лимфоидные или нелимфоидные, были сведены в таблицу. См. табл. 10.

Табл. 10. Согласованность идентификации аномальных незрелых кроветворных клеток как лимфоидных или нелимфоидных

		Сравнительный метод (система EuroFlow)		Всего
		Нелимфоидные	Лимфоидные	
Исследуемый метод (система BD OneFlow)	Нелимфоидные	49	0	49
	Лимфоидные	0	44	44
	Всего	49	44	93

Общий % согласованности — 100 %. Нижний 95%-й доверительный предел — 96,8 %.

Эквивалентность (для проточных цитометров BD FACSCanto II)

Для каждого образца была выполнена качественная оценка клеточных популяций на наличие или отсутствие ключевых маркеров BD OneFlow ALOT. Образцы были проанализированы при помощи системы BD OneFlow и соответствующей системы EuroFlow, описанных выше. Была рассчитана общая согласованность двух систем с точки зрения оценки наличия или отсутствия экспрессии указанных маркеров в образцах. См. табл. 11.

Табл. 11. Эквивалентность системы BD OneFlow и системы EuroFlow

Маркер	Общий % согласованности с точки зрения экспрессии маркера	Нижний 95%-й CL общего % согласованности
CD45 ^{neg} /dim	100 %	96,8 %
CD45 ^{neg} /dim и cyCD3	100 %	96,8 %
CD45 ^{neg} /dim и CD3	100 %	96,8 %
CD45 ^{neg} /dim и CD19	100 %	96,8 %
CD45 ^{neg} /dim и cyCD79a	100 %	96,8 %
CD45 ^{neg} /dim и cyMPO	100 %	96,8 %

Результаты сравнения методов и исследований эквивалентности свидетельствуют, что эти две системы по существу эквивалентны.

11. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблемы, связанные с подготовкой или окрашиванием клеток

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и клеток	Образец был чрезмерно пермеабиллизирован	Повторите окрашивание. Инкубируйте пробирку с пермеабиллизующим раствором FIX & PERM Reagent B не более 15 минут
	Плохое качество образца	Проверьте жизнеспособность клеток
	Образец слишком старый	Возьмите новый образец и немедленно его окрасьте
Цитоплазма окрашена тускло (суMPO, суCD79a, суCD3)	Неполная пермеабиллизация клеток	Повторите окрашивание. Тщательно измерьте объем образца на этапах фиксации и пермеабиллизации клеток, чтобы отношение объема фиксированного образца к пермеабиллизующему раствору FIX & PERM Reagent B составляло 1 : 1
Клетки слиплись после фиксации	Неполное ресуспендирование клеток перед фиксацией	Перед добавлением фиксирующего раствора FIX & PERM Reagent A встряхните пробирки на «вортексе», чтобы не осталось клеточных агрегатов
	Недостаточно тщательное промывание клеток после фиксации	1. Зафиксируйте клетки с помощью раствора FIX & PERM Reagent A. 2. Добавьте промывочный буфер и инкубируйте в течение 2 минут в темном месте. 3. Центрифугируйте пробирки и перейдите к этапу пермеабиллизации

Проблема	Возможная причина	Решение
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток
	Пробирка BD OneFlow слишком долго была на свету	Повторите окрашивание с использованием новой пробирки BD OneFlow
	Окрашенные клетки слишком долго хранились перед сбором данных	Выполните окрашивание свежего образца и проведите сбор данных немедленно
Зарегистрировано слишком мало клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспенсируйте свежий образец с более высокой концентрацией. Повторите окрашивание и сбор данных
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора. Дополнительную информацию см. в руководстве по эксплуатации цитометра

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow ALOT на проточных цитометрах BD FACSLytic

Проблема	Возможная причина	Решение
Собрано недостаточно нужных клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспенсируйте свежий образец с более высокой концентрацией. Повторите окрашивание и сбор данных
	Слишком низкое значение по умолчанию — 100 000 событий для сбора	Измените количество событий для сбора. Повторите окрашивание и сбор данных. Дополнительную информацию см. в <i>Руководстве по применению системы BD OneFlow™</i> при острых лейкозах для проточных цитометров BD FACSLytic™.
Аномальный точечный график FSC-A против SSC-A	Необходима настройка цитометра	Обратитесь в компанию BD Biosciences

Проблема	Возможная причина	Решение
Файл CSV и отчет не экспортируются автоматически	Номер партии реагента и срок годности не были вручную добавлены в библиотеку	1. Добавьте номер партии реагента и срок годности в библиотеку. 2. Экспортируйте файл CSV и PDF-отчет вручную. См. <i>Инструкции по эксплуатации клинической системы BD FACSLytic™</i>

Проблемы, которые могут возникнуть при эксплуатации BD OneFlow ALOT на проточных цитометрах BD FACSCanto II

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора. Подробнее см. в <i>Руководстве по настройке прибора для анализов BD OneFlow™</i>
Некоторые точечные графики недоступны	Не выбраны FSC-H и SSC-H при создании параметров приложения	Убедитесь, что FSC-H и SSC-H выбраны на вкладке Parameters (Параметры) окна Inspector (Инспектор)
Не удается отсканировать штрихкод на этикетке пробирки BD OneFlow ALOT (C)	Штрихкод на этикетке пробирки испорчен	Отсканируйте штрихкод на этикетке пакета с пробирками BD OneFlow ALOT (C) в поле Product ID (Идентификатор продукта) в разделе Experiment Layout (План эксперимента). Затем вручную введите после последней цифры штрихкода точку с запятой (;) и шестизначный код пробирки, который указан рядом со штрихкодом на этикетке пробирки
На рабочих листах отсутствуют точечные графики, или на точечных графиках отсутствуют гейты	Шаблон импортирован неправильно	1. Закройте текущий эксперимент. 2. Создайте новый эксперимент. 3. Повторно импортируйте шаблон OneFlow ALOT

Проблема	Возможная причина	Решение
Некоторые ключевые слова отсутствуют в таблице статистики на рабочем листе анализа данных	Программное обеспечение BD FACSDiva не импортировало некоторые ключевые слова в шаблон панели	1. В окне Browser (Средство просмотра) установите указатель текущей пробирки на анализируемую пробирку. 2. Перейдите на рабочий лист анализа данных. 3. Щелкните таблицу статистики правой клавишей мыши и выберите Edit Stats View (Редактировать отображение статистики). 4. На вкладке Header (Заголовок) установите флажок All (Все). 5. Нажмите OK.
Заявление For in vitro diagnostic use (Для использования в диагностике in vitro) отсутствует в нижнем колонтитуле распечатанного рабочего листа анализа данных	Изменены размеры полей листа при печати	1. В строке меню программного обеспечения BD FACSDiva выберите File > Page Setup (Файл > Параметры страницы). 2. Убедитесь, что все поля составляют 2,54 см или 1 дюйм в зависимости от стандартов по умолчанию. 3. Нажмите OK.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В СООТВЕТСТВИИ С НАСТОЯЩИМ ДОКУМЕНТОМ ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА РАСПРОСТРАНЯЮТСЯ НА ПРОДАННЫЕ ИЗДЕЛИЯ ТОЛЬКО С ЦЕЛЬЮ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И СОДЕРЖИМОГО, ЗАЯВЛЕННОГО НА ЭТИКЕТКЕ ИЛИ НА МАРКИРОВКЕ ИЗДЕЛИЯ В МОМЕНТ ДОСТАВКИ ЕГО ЗАКАЗЧИКУ. КОМПАНИЯ BD ОТКАЗЫВАЕТСЯ ОТ ВСЕХ ДРУГИХ ГАРАНТИЙ, ЯВНЫХ И НЕЯВНЫХ, ВКЛЮЧАЯ ГАРАНТИИ ПРИГОДНОСТИ И СООТВЕТСТВИЯ ДЛЯ ЛЮБОЙ КОНКРЕТНОЙ ЦЕЛИ, А ТАКЖЕ ГАРАНТИИ НЕНАРУШЕНИЯ ПАТЕНТОВ. ИСКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ BD ОГРАНИЧИВАЕТСЯ

ЗАМЕНОЙ ИЗДЕЛИЙ ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ПОКУПНОЙ ЦЕНЫ. КОМПАНИЯ ВД НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА МАТЕРИАЛЬНЫЙ УЩЕРБ ИЛИ ЛЮБЫЕ СЛУЧАЙНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ, ВКЛЮЧАЯ ТРАВМЫ ИЛИ ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОТЕРИ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗДЕЛИЕМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26:1908-1975.
- 2 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26:1986-2010.
- 3 Pulford KA, Erber WN, Crick JA, et al. Use of monoclonal antibody against human neutrophil elastase in normal and leukaemic myeloid cells. *J Clin Pathol*. 1988;41:853-860.
- 4 Engel P, Wagner N, Tedder TF. CD79 Workshop report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:667-670.
- 5 Appendix C. Summary of antibody names, code numbers, and donor laboratories. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:988-993.
- 6 McMichael AJ, Gotch FM. T-cell antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:31-62.
- 7 Greaves MF, Titley I, Colman SM, et al. CD34 cluster workshop report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. Vol 1. New York, NY: Oxford University Press; 1995:840-846.
- 8 Ling NR, MacLennan ICM, Mason DY. B-cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:302-335.
- 9 Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and Comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-43.
- 10 Reiter C. Cluster report: CD7. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:341-342.
- 11 Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.

- 12 Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
- 13 Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leukocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
- 14 Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
- 15 Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
- 16 Davis BH, Dasgupta A, Kussick S, Han JY, Estrellado A; on behalf of ICSH/ICCS working group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - Part II - Preanalytical issues. *Cytometry Part B*. 2013;84B:286-290.
- 17 Nicholson JKA, Green TA. Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping: effect of specimen age on results. *J Immunol Methods*. 1993;165:31-35.
- 18 Paxton H, Bendele T. Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann NY Acad Sci*. 1993;677:440-443.
- 19 Stetler-Stevenson M, Ahmad E, Barnett D et al. *Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document H43-A2.
- 20 Stetler-Stevenson M, Greig B, Yuan C. Flow cytometric specimen collection, processing, and reporting. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, eds. *Laboratory Hematology Practice*. First Edition. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell Inc.; 2012:105-114.
- 21 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
- 22 Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.

ИСТОРИЯ

Редакция	Дата	Внесенные изменения
23-18897-00	7/2017	Первый выпуск
23-18897-01	5/2020	Переработано для поддержки использования продукта на проточных цитометрах BD FACSLytic



CD4 (SK3)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD4

Форма	№ по каталогу
FITC	345768
PE	345769
PerCP	345770
PerCP-Cy5.5	332772
PE-Cy7	348809
APC	345771
APC-Cy7	341115

1/2014

23-13694-04



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
 2350 Qume Drive
 San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
 Pottery Road, Dun Laoghaire,
 Co. Dublin, Ireland
 Tel +353.1.202.5222
 Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
 Tel +32.2.400.98.95
 Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
 4 Research Park Drive,
 Macquarie University Research Park,
 North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD4 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD4, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD4 в исследовании гематологической неоплазии¹

2. СОСТАВ

CD4, клон SK3, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных Т-лимфоцитами периферической крови человека. CD4 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в табл. 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	6,0 мкг в 2,0 мл PBS	3
PE	6,0 мкг в 2,0 мл PBS	3
PerCP	6,0 мкг в 2,0 мл PBS	3
PerCP-Cy™5.5b	1,5 мкг в 1,0 мл PBS	1,5
PE-Cy™7	6 мкг в 0,5 мл PBS	12

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
APC	3,0 мкг в 0,5 мл PBS	6
APC-Cy7 ^с	6 мкг в 0,5 мл PBS	12

а. Конц. = концентрация

б. Cy7[™] — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики in vitro. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт неразпакованным в BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

с. APC-Cy7: патент США № 5714386

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7: ≤20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока годности, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока годности. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые полистирольные пробирки с крышками 12 x 75 мм Falcon®* (№ по каталогу 3520580 или аналогичные)
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACS[™] Lysing Solution (10X) (№ по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагента.
- Центрифуга
- BD CellWASH[™] (№ по каталогу 349524) или промыочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- BD CellFIX[™] (№ по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть рассмотрены до отбора образцов и анализа^{2, 3}.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток².

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{4, 5} и при утилизации соблюдайте меры предосторожности в соответствии с законами, принятыми на федеральном, региональном и местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD4. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution.

4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты APC-Cy7 и в меньшей степени — конъюгаты PE-Cy7 и APC-H7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида или света. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

Аналитические результаты

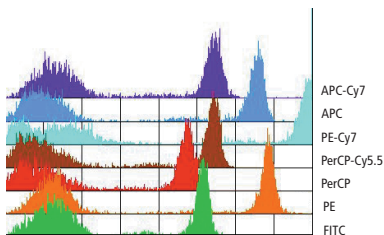
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или аберрантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр⁶. Соберите и проанализи-

зируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рис. 1 представлены репрезентативные данные, полученные на мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) и гейтированные по лимфоцитам. Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуется использовать гранулы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы⁷.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Антиген CD4^{8, 9} молекулярной массой 55 килодальтон (кДа)¹⁰ присутствует на Т-лимфоцитах хелперах/индукторах и моноцитах^{11, 12}.

Антиген CD4 присутствует на подмножестве Т-лимфоцитов хелперов/индукторов (CD3⁺CD4⁺), которое составляет от 28 % до 58 %¹³ нормальных лимфоцитов периферической крови^{9, 10}. Антиген CD4 с низкой плотностью присутствует на клеточной поверхности моноцитов и в цитоплазме моноцитов.

Чувствительность

Чувствительность определяется как степень разделения популяций CD4⁺ и CD4⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD4⁺ и CD4⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD4⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD4 был представлен на рассмотрение на Первой международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (First International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens).

Участвовавшие лаборатории оценивали клон SK3 как часть скрытой панели анти-тел и сообщили согласующиеся друг с другом результаты⁸.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано значение средней интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в табл. 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные среднеквадратичные отклонения (SD) определяли по парным результатам для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку повторяемости в пределах образца.

Таблица 2. Повторяемость MFI CD4 T-лимфоцитов хелперов/индукторов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	7	154,5	7,86	5,09
PE	21	1041,4	86,33	8,30
PerCP	26	133,9	17,17	12,83
PerCP-Cy5.5	3	316,44	20,19	6,38
PE-Cy7	3	1306,3	198,29	15,18
APC	3	1162,5	56,35	4,85
APC-Cy7	6	479,1	57,95	12,10

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем конъюгаты с другими красителями (FITC, PerCP). Если популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся подобному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реагентов.³

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТК. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Искключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.

Проблема	Возможная причина	Решение
Густая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством анти-тел.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен аزيد натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте аزيد натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferrara F, Cimino R, Antinolfi I, et al. Clinical relevance of immunological dissection in T-ALL: a report on 20 cases with stem cell (CD7+, CD4-, CD8-, CD1-) phenotype. *Am J Hematol*. 1992;40:98-102.
2. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
3. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P, Jr., Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
4. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards; 2005. CLSI document M29-A3.
5. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal

- precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
6. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
 7. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
 8. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:9-108.
 9. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to the T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.
 10. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.
 11. Engleman EG, Benike CJ, Glickman E, Evans RL. Antibodies to membrane structures that distinguish suppressor/cytotoxic and helper T lymphocyte subpopulations block the mixed leukocyte reaction in man. *J Exp Med*. 1981;153:193-198.
 12. Kotzin BK, Benike CJ, Engleman EG. Induction of immunoglobulin secreting cells in the allogeneic mixed leukocyte reaction: regulation by helper and suppressor lymphocyte subsets in man. *J Immunol*. 1981;127:931-935.
 13. Reichert T, DeBruyère M, Deney V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.



CD19 (4G7)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD19.

Форма	Номер по каталогу
FITC	345776
PE	345777
PerCP	345778

11/2013

23-13700-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
 2350 Qume Drive
 San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
 Pottery Road, Dun Laoghaire,
 Co. Dublin, Ireland
 Tel +353.1.202.5222
 Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
 Tel +32.2.400.98.95
 Fax +32.2.401.70.94
 help.bdbiosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
 4 Research Park Drive,
 Macquarie University Research Park,
 North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD19 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD19, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD19 в исследовании гематологической неоплазии¹

2. СОСТАВ

CD19, клон 4G7, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками хронического лимфолейкоза человека (CLL). CD19 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	50 мкг в 2,0 мл PBS	25
PE	12,5 мкг в 1,0 мл PBS	12,5
PerCP	12,6 мкг в 2,0 мл PBS	6,3

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤ 5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP: ≤ 20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACS™ lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промыочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- BD CellFIX™ (номер по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Для подготовки образцов крови к анализу методом проточной цитометрии используйте процедуру подготовки лизированной цельной крови (LWB) или одноядерных клеток периферической крови (PBMC). Рекомендуется использовать процедуру LWB², поскольку качество препаратов PBMC сильнее зависит от техники.³

Проведите забор крови асептически с помощью венопункции^{3,4} в стерильную пробирку для забора крови с ЭДТА. Для подготовки LWB необходимо не меньше 1 мл цельной крови, для подготовки PBMC — не меньше 2 мл. До готовности к окрашиванию храните кровь с антикоагулянтom при комнатной температуре (20–25 °C) не больше 6 часов. Перед окрашиванием выполните подсчет лейкоцитов (WBC) и дифференцированный подсчет лейкоцитов одного и того же образца цельной крови.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{5,6} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на феде-

ральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки. Известно, что фиксация инактивирует ВИЧ.⁷

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD19. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 500g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 500g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

Аналитические результаты

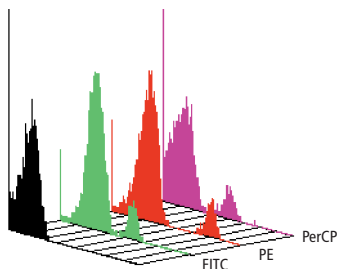
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрес-

сирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр.⁸ Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на цельной крови и гейтированные по лимфоцитам. Лазерное возбуждение при длине волны 488 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



ПРИМЕЧАНИЕ Неправильная настройка гейта на данных образцов может привести к неправильным результатам.

Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и Руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы³.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Реагент CD19 распознает антиген В-лимфоцитов человека с молекулярным весом 90 килодальтон⁹.

Антиген CD19 присутствует на приблизительно 7–23 % лимфоцитов периферической крови человека¹⁰ и на спленоцитах¹¹. Антиген CD19 присутствует на В-лимфоцитах человека любой степени зрелости.^{12,13} CD19 не реагирует с покоящимися или активированными Т-лимфоцитами, гранулоцитами и моноцитами.¹²⁻¹⁴

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD19⁺ и CD19⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD19⁺ и CD19⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD19⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD19 был представлен на рассмотрение на Четвертой международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон 4G7 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты.¹⁵

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента,

что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI В-лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№а	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	26	81,06	5,53	6,82
PE	6	532,6	55,46	10,41
PerCP	27	51,3	3,78	7,36

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). Когда популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реагентов.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.

Проблема	Возможная причина	Решение
Густая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством анти-тел.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cabezu E, Carrara P, Morilla R, Matutes E. Quantitative analysis of CD79b, CD5 and CD19 in mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica*. 1999;84:413-418.
2. Centers for Disease Control. 1997 Revised guidelines for performing CD4⁺ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*. 1997;46:1-29.
3. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
4. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
5. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.

6. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
7. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993;160:215-218.
8. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
9. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to the T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.
10. Reichert T, DeBruyère M, Deney V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
11. Tedder T, Zhou L-J, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15:437-442.
12. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B-lymphocyte development. *Blood*. 1987;70:1316-1324.
13. Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:3-43.
14. Kotzin BK, Benike CJ, Engleman EG. Induction of immunoglobulin secreting cells in the allogeneic mixed leukocyte reaction: regulation by helper and suppressor lymphocyte subsets in man. *J Immunol*. 1981;127:931-935.
15. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.



CD25 (2A3)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD25

Форма	Номер по каталогу
FITC	345796
PE	341011
PE-Cy7	335824
APC	340907

8/2013

23-13677-04



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
 2350 Qume Drive
 San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
 Pottery Road, Dun Laoghaire,
 Co. Dublin, Ireland
 Tel +353.1.202.5222
 Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
 Tel +32.2.400.98.95
 Fax +32.2.401.70.94
 help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
 4 Research Park Drive,
 Macquarie University Research Park,
 North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD25 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD25, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия CD25 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻⁴

2. СОСТАВ

CD25, клон 2A3, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных РНА-активированными человеческими Т-лимфоцитами. CD25 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	20 мкг в 2,0 мл PBS	10
PE	3 мкг в 1,0 мл PBS	3
PE-Cy7 ^{7b}	6,5 мкг в 0,5 мл PBS	13
APC	6 мкг в 0,5 мл PBS	12

а. Конц. = концентрация

- b. Сутм — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: $\leq 5\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PE-Cy7, APC: $\leq 20\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Храните пузырьки с антителами в сухой среде.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ МАТЕРИАЛЫ

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные

- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- BD FACST[™] lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASH[™] (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азид натрия
- Раствор BD CellFIX[™] (номер по каталогу 340181) или 1%-ный раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азид натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть рассмотрены до отбора образцов и анализа^{5,6}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомен-

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

дваемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁵.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращаясь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{7,8} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12х75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD25. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.

7. Добавьте 0,5 мл BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты PE-Cy7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

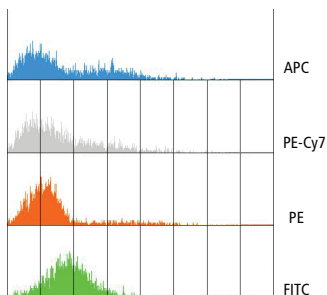
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на мешалке «вортекс» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их обработкой на проточном цитометре⁹. Перед сбором образцов отрегулируйте пороговое значение, чтобы максимально исключить клеточные обломки и убедиться, что интересующие популяции вас популяции включены. Соберите и проанализируйте данные пациентов, собранные в виде списка, с помощью соответствующего программного обеспечения. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на нормальных покоящихся лейкоцитах лизированной цельной крови и гейтированные по лимфоцитам. Возбуждение лазером проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ beads и программное обеспечение BD FACSComp™ software, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации частиц *BD Calibrite Beads* и Руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы¹⁰.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD25 (Anti-IL-2R α) распознает антиген, являющийся альфа-цепью человеческих низкоаффинных рецепторов интерлейкин-2 (IL-2R α)¹¹. Антиген имеет молекулярный вес 55 килодальтон (кДа)¹².

Антиген CD25 присутствует на подмножестве лимфоцитов периферической крови¹³. Плотность антигена повышается на Т-лимфоцитах, активированных фитогемагглютинином (PHA), конканавалином А (Con A) и CD3; Т-лимфоцитах со смешанных лимфоцитарных культур; и Т-лимфоцитарных линиях лейкоза, зараженных Т-лимфоцитарным вирусом лейкоза человека (HTLV), например, HUT-102¹⁴⁻¹⁷. Рекombинантный IL-2 блокирует привязку CD25 к PHA-активированным Т-лимфоцитам¹⁸.

Кроме того, антиген CD25 наблюдался на В-клетках CD20⁺. В лимфоидных тканях он экспрессируется на рассеянных больших и малых лимфоцитах в герминальных центрах, в мантии фолликулов и в Т-зоне. В тимусе положительные клетки находятся в медуллярной области, а кортикальные тимоциты являются отрицательными¹¹.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение популяции CD25⁺ от популяции CD25⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реактива тестировалась на Т-клетках. Разделения CD25⁺ от CD25⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация разлива антител для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность в разрешении клеток CD25⁺ от соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD25 был представлен на рассмотрение на Четвертом международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали

клон 2A3 как часть скрытой панели анти-тел и сообщили согласующиеся результаты¹².

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI T-клеток по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC ^c	15	479,1	55,89	11,67
PE ^d	5	136,53	25,32	18,54
PE-Cy7	3	319,2	20,95	6,56
APC ^c	3	44,72	3,80	8,50

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

c. CD3 + IL-2-активированные одноклеточные клетки периферической крови (PBMC)

d. цельная кровь в покое

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). В случае частичного перекрытия популяций, на расчет процента клеток, положительных по какому-либо маркеру, может повлиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реактивов⁶.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в совокупности с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, с добавлением ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИИ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Неадекватные параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком высока на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством анти-тел.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен аزيد натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте аزيد натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспандируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freedman AS, Nadler LM. Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1991;5:871-889.
2. DiGiuseppe JA, Borowitz MJ. Clinical Utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin Oncol.* 1998;25:6-10.

3. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houliham A, Meeus P, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma.* 1994;14:57-61.
4. Nagatani T, Miyazawa M, Matsuzaki T, et al. Comparative study of cutaneous T-cell lymphoma and adult T-cell leukemia/lymphoma. *Semin Dermatol.* 1994;13:216-222.
5. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
6. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry.* 1997;30:214-230.
7. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
8. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR.* 1988;37:377-388.
9. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
10. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
11. Sasaki Y, Sugamura K. CD25 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGK, et al, eds. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Garland Publishing, Inc; 1997:802-803.
12. Schwarting R, Stein H. Cluster report: CD25. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:399-402.
13. Jackson AL, Matsumoto H, Janszen M, Maino V, Bldy A, Shye S. Restricted expression of p55

- interleukin 2 receptor (CD25) on normal T cells. *Clin Immunol Immunopath.* 1990;54:126-133.
14. Leonard WJ, Depper JM, Uchiyama T, Smith KA, Waldman TA, Greene WC. A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T cell growth factor: partial characterization of the receptor. *Nature.* 1982;300:267-269.
 15. Greene WC, Leonard WJ. The human interleukin-2 receptor. *Annu Rev Immunol.* 1986;4:69-95.
 16. Siegal J, Sharon M, Smith PL, Leonard WJ. The IL-2 receptor β chain (p 70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science.* 1987;238:75-78.
 17. Rambaldi A, Young DC, Herrmann F, Cannistra SA, Griffin JD. Interferon- γ induces expression of the interleukin 2 receptor gene in human monocytes. *Eur J Immunol.* 1987;17:153-156.
 18. Urdal DL, March CJ, Gillis S, Larsen A, Dower SK. Purification and chemical characterization of the receptor for interleukin 2 from activated human T lymphocytes and from a human T-cell lymphoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81:6481-6485.



CD33 (P67.6)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD33

Форма	Номер по каталогу
FITC	345798
PE	345799
PerCP-Cy5.5	333146
PE-Cy7	333952
APC	345800

8/2013

23-13702-03



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
 2350 Qume Drive
 San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
 Pottery Road, Dun Laoghaire,
 Co. Dublin, Ireland
 Tel +353.1.202.5222
 Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
 Tel +32.2.400.98.95
 Fax +32.2.401.70.94
 help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
 4 Research Park Drive,
 Macquarie University Research Park,
 North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
 ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD33 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD33, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ Pro или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия CD33 в исследовании гематологической неоплазии^{1,2}

2. СОСТАВ

CD33, клон P67.6, получен гибридизацией клеток миеломы Sp2/0 мышей с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками FMY9S5, содержащими ген CD33. CD33 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	3 мкг в 1,0 мл PBS	3
PE	24 мкг в 2,0 мл PBS	12
PerCP-Cy5.5 ^b	6,3 мкг в 1,0 мл PBS	6,3
PE-Cy7 ^b	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25
APC	6,2 мкг в 0,5 мл PBS	12,4

а. Конц. = концентрация

- b. Сут[™] — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: $\leq 5\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC: $\leq 20\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Храните пузырьки с антителами в сухой среде.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ МАТЕРИАЛЫ

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- BD FACST[™] lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASH[™] (номер по каталогу 349524) или буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия.
- Раствор BD CellFIX[™] (номер по каталогу 340181) или 1%-ный раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть рассмотрены до отбора образцов и анализа^{3,4}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток³.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{5,6} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD33. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.

7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты PE-Cy7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

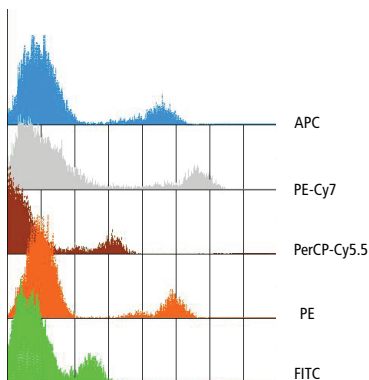
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на мешалке «вортекс» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их обработкой на проточном цитометре⁷. Перед сбором образцов отрегулируйте пороговое значение, чтобы максимально исключить клеточные обломки и убедиться, что интересные популяции вас популяции включены. Соберите и проанализируйте данные пациентов, собранные в виде списка, с помощью соответствующего программного обеспечения. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на цельной крови и гейтированные по моноцитам и лимфоцитам. Возбуждение лазером проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ beads и программное обеспечение BD FACSComp™ software, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации частиц *BD Calibrite Beads* и Руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы⁸.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Реагент CD33 распознает человеческий миеломоноцитный антиген с молекулярным весом 67 килодальтон (кДа)⁹.

Антиген CD33 присутствует на моноцитах (яркие) и гранулоцитах (тусклые)¹⁰. Гранулоциты могут быть далее подразделены на популяции нейтрофилов, эозинофилов и базофилов на основе окрашивания CD33 в сочетании с другими поверхностными антигенами клетки¹⁰. Антиген CD33 также обнаружен на смешанных КОЕ, КОЕ-ГМ, КОЕ-Meg, части BFU-E, миело-бластах, промиелоцитах, миелоцитах и метамиелоцитах, но не на более ранних предшественниках^{1,11-13}. Антиген CD33 экспрессируется на бластных клетках в более чем 85 % острых миелоидных лейкозов (AML), он также может ошибочно экспрессироваться при острых лимфобластных лейкозах (ALL)². Нормальные лимфоциты, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют антиген CD33¹¹.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение популяции CD33⁺ от популяции CD33⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделения CD33⁺ от CD33⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация разлива антител для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность в разрешении клеток CD33⁺ от соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD33 был представлен на рассмотрение на Четвертом международном семинаре-конференции по дифференцированным

антигенам лейкоцитов человека (Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон Р67.6 как часть скрытой панели анти-тел и сообщили согласующиеся результаты⁹.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI моноцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	3	70,23	0,51	0,73
PE	26	492,5	51,48	10,45
PerCP-Cy5.5	4	81,0	21,9	27,04
PE-Cy7	3	626,83	69,55	11,10
APC	3	271,2	18,05	6,66

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). В случае частичного перекрытия популяций,

на расчет процента клеток, положительных по какому-либо маркеру, может повлиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реактивов⁴.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в совокупности с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, с добавлением ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержания, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность

компания BD ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЗАМЕНОЙ ИЗДЕЛИЙ ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ПОКУПНОЙ ЦЕНЫ. КОМПАНИЯ BD НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА МАТЕРИАЛЬНЫЙ УЩЕРБ ИЛИ ЛЮБЫЕ СЛУЧАЙНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ, ВКЛЮЧАЯ ТРАВМЫ ИЛИ ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОТЕРИ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗДЕЛИЕМ.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком высока на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством анти-тел.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dinndorf PA, Andrews RG, Benjamin D, Ridgway D, Wolff L, Bernstein ID. Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells. *Blood*. 1986;67:1048-1053.
2. Foon KA, Todd RF III. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 1986;68:1-31.
3. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
4. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
5. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
6. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
7. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
8. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
9. Köller U, Peschel CH. Cluster report: CD33. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:812-813.
10. Terstappen LW, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol*. 1990;48:138-148.
11. Bernstein ID, Singer JW, Andrews RG, et al. Treatment of acute myeloid leukemia cells in vitro with a monoclonal antibody recognizing a myeloid differentiation antigen allows normal progenitor cells to be expressed. *J Clin Invest*. 1987;79:1153-1159.

12. Andrews RG, Torok-Storb B, Bernstein ID. Myeloid-associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies. *Blood*. 1983;62:124-132.
13. Andrews RG, Takahashi M, Segal GM, Powell JS, Bernstein ID, Singer JW. The L4F3 antigen is expressed by unipotent and multipotent colony-forming cells but not by their precursors. *Blood*. 1986;68:1030-1035.



CD56 (MY31)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD56.

Форма **Номер по каталогу**
PE **345810**

11/2013

23-13742-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD56 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD56, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD56 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻⁶

2. СОСТАВ

CD56, клон MY31, получен гибридизацией клеток миеломы Sp2/0 мышей с клетками селезенки мышей (B6 x BALB/c) F₁, иммунизированных клеточной линией KG1a. CD56 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
PE	100 мкг в 2,0 мл PBS	50

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- PE: ≤20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACS™ lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия.
- BD CellFIX™ (номер по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга, а также другие жидкости организма и ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{6,7}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁶.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{8,9} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки. Известно, что фиксация инактивирует ВИЧ.¹⁰

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий

объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD56. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 500g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 500g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

Аналитические результаты

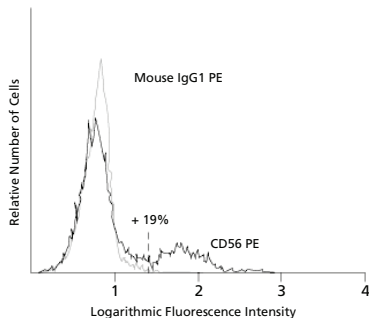
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в про-

точный цитометр.¹¹ Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) и гейтированные по лимфоцитам. Лазерное возбуждение при длине волны 488 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и Руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы¹².

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD56¹³ распознает антиген, присутствующий на естественных лимфоцитах-киллерах, который представляет собой изоформу молекулы адгезии нервных клеток (NCAM) массой 140 килодальтон (кДа).¹⁴ В зрелом антигене белок сердцевины массой 140 кДа в значительной степени гликозилирован.^{15,16}

Антиген CD56 присутствует приблизительно на 10–25 % лимфоцитов периферической крови. Он присутствует практически на всех покоящихся и активированных естественных лимфоцитах-киллерах CD16⁺ и приблизительно на 5 % лимфоцитов периферической крови CD3⁺.¹³

Чувствительность

Чувствительность определяется как разделение разделения популяций CD56⁺ и CD56⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD56⁺ и CD56⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD56⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD56 был представлен на рассмотрение на Четвертом международном семинаре-конференции по дифференцированным

антигенам лейкоцитов человека (Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон MY31 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты.¹⁶

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI CD56⁺ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
PE	30	161,9	24,11	14,89

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). Когда популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реа-

гентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реагентов.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержания, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделия либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Неадекватные параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен аزيد натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте аزيد натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loughran TP Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood*. 1993;82:1-14.
2. Mason WR, Williams ME, Greer JP, et al. Natural killer-like T-cell lymphomas: aggressive lymphomas of T-large granular lymphocytes. *Blood*. 1996;87:1474-1483.

3. Okuno SH, Tefferi A, Hanson CA, Katzmman JA, Li CY, Witzig TE. Spectrum of diseases associated with increased proportions or absolute numbers of peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol*. 1996;93:810-812.
4. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*. 1998;152:1655-1665.
5. Van Camp B, Durie BG, Spier C, et al. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood*. 1990;76:377-382.
6. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
7. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
8. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
9. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
10. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993;160:215-218.
11. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
12. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
13. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
14. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of the Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989;169:2233-2238.
15. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol*. 1991;146:4421-4426.
16. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.



CD56 (NCAM16.2)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD56.

Форма	Номер по каталогу
FITC	345811
PE	345812
PE-Cy7	335826
APC	341027

10/2013

23-13705-04



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
 2350 Qume Drive
 San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
 Pottery Road, Dun Laoghaire,
 Co. Dublin, Ireland
 Tel +353.1.202.5222
 Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
 Tel +32.2.400.98.95
 Fax +32.2.401.70.94
 help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
 4 Research Park Drive,
 Macquarie University Research Park,
 North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
 ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD56 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD56, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD56 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻⁶

2. СОСТАВ

CD56, клон NCAM16.2, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных молекулами адгезии нервных клеток (NCAM) мозга взрослого человека с иммуноаффинным обогащением. CD56 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG_{2b} и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	6 мкг в 1,0 мл PBS	6
PE	12,5 мкг в 1,0 мл PBS	12,5
PE-Cy7 ^{7b}	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25
APC	6 мкг в 0,5 мл PBS	12

а. Конц. = концентрация

- b. Су™ — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики in vitro. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: $\leq 5\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PE-Cy7, APC: $\leq 20\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные

- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACST™ lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия.
- Раствор BD CellFIX™ (номер по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{6,7}.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуются предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁶.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{8,9} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD56. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.

4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты PE-Cy7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

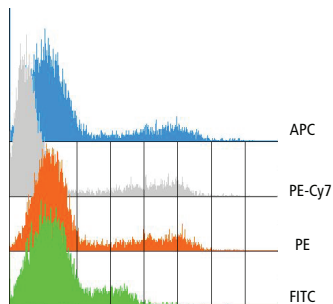
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр.¹⁰ Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на периферической крови и гейтированные по лимфоцитам CD3⁺. Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул BD Calibrite Beads и Руководство

пользователя программного обеспечения BD FACSComp Software User's Guide.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы¹¹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD56 распознает внеклеточный иммуноглобулиноподобный домен, общий для трех форм NCAM с молекулярной массой 120, 140 и 180 килодальтон (кДа).¹²⁻¹⁴

Антиген CD56 присутствует на приблизительно 10–25 % лимфоцитов периферической крови.¹⁵ Он присутствует практически на всех покоящихся и активированных естественных лимфоцитах-киллерах CD16⁺ и на приблизительно 5 % лимфоцитов периферической крови CD3⁺.¹⁵

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD56⁺ и CD56⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD56⁺ и CD56⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD56⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD56 был представлен на рассмотрение на Четвертом международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон NCAM16.2 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты.¹³

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI CD56⁺ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	14	39,1	3,08	7,89
PE	21	173,8	18,81	10,82
PE-Cy7	3	235,0	8,47	3,6
APC	3	410,3	12,61	3,07

а. N = количество образцов

б. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). Когда популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов⁷.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Искключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедуре настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.

Проблема	Возможная причина	Решение
Густая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством анти-тел.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен аزيد натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте аزيد натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Loughran TP Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood*. 1993;82:1-14.
- Macon WR, Williams ME, Greer JP, et al. Natural killer-like T-cell lymphomas: aggressive lymphomas of T-large granular lymphocytes. *Blood*. 1996;87:1474-1483.
- Okuno SH, Tefferi A, Hanson C, Katzmann JA, Li CY, Witzig TE. Spectrum of diseases associated with increased proportions or absolute numbers of peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol*. 1996;93:810-812.
- Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*. 1998;152:1655-1665.
- Van Camp B, Durie BG, Spier C, et al. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood*. 1990;76:377-382.

6. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
7. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
8. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
9. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
10. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
11. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
12. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol*. 1991;146:4421-4426.
13. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
14. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*. 1987;236:799-806.
15. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.



CD2 (S5.2)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD2.

Форма	Номер по каталогу
FITC	347404
PE	347405
PE-Cy7	335821
APC	341024

10/2013

23-13693-03



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
 2350 Qume Drive
 San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
 Pottery Road, Dun Laoghaire,
 Co. Dublin, Ireland
 Tel +353.1.202.5222
 Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
 Tel +32.2.400.98.95
 Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
 4 Research Park Drive,
 Macquarie University Research Park,
 North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD2 предназначен для диагностической идентификации in vitro клеток, экспрессирующих антиген CD2, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD2 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻³

2. СОСТАВ

CD2, клон S5.2, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных Т-лимфоцитами, активированными смешанной культурой лимфоцитов. CD2 состоит из тяжелых цепей иммуноглобулина мыши IgG_{2a} и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	25 мкг в 2,0 мл PBS	12,5
PE	12,5 мкг в 2,0 мл PBS	6,25
PE-Cy7 ^{mb}	25 мкг в 0,5 мл PBS	50
APC	25 мкг в 0,5 мл PBS	50

а. Конц. = концентрация

- b. Сут[™] — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: $\leq 5\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PE-Cy7, APC: $\leq 20\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon[®]* или аналогичные

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACS[™] lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- BD CellWASH[™] (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- BD CellFIX[™] (номер по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{4,5}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁴.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Все биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, считаются биологически опасными. Обращайтесь с ними как с потенциальными источниками инфекции^{6,7} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD2. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальде-

гида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Эмиссионные спектры некоторых конъюгатов PE-Cy7 меняются при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

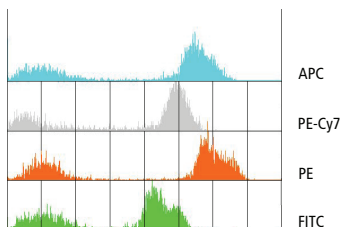
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или аберрантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр.⁸ Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на обработанной ЭДТА лизированной цельной крови и гейтированные по лимфоцитам. Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать гранулы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы⁹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD2 распознает человеческий лимфоцитарный антиген размером от 45 до 50 килодальтон (кДа)¹⁰, который также образует участок связывания для овечьих эритроцитов.¹¹

Антиген CD2 присутствует приблизительно на 75 % нормальных лимфоцитов периферической крови и на 95–99 % тимоцитов¹¹. Он также обнаруживается на субпопуляции моноцитов

(приблизительно одной трети), которые могут быть прекурсорами дендритных клеток¹². Антитела CD2 реагируют практически со всеми Т-лимфоцитами и с субпопуляцией естественных клеток-киллеров¹³. Показано, что CD2 и CD58 являются корцепторами; взаимодействие антигена CD2 и антигена CD58 способствует распознаванию антигенов Т-лимфоцитами^{14–16}.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD2⁺ и CD2⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD2⁺ и CD2⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD2⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD2 был представлен на рассмотрение на Второй международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Second International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценили клон S5.2 как часть слепой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты. На тот момент данное антитело называлось Leu-5b.¹⁷

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности

флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по парным результатам для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI CD2⁺ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	24	108,97	15,03	13,79
PE	13	556,29	89,34	16,06
PE-Cy7	3	331,4	24,68	7,45
APC	3	864,8	127,51	14,74

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем конъюгаты с другими красителями (FITC, PerCP). Если популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся подобному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование

сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов⁵.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе, в любых применимых общих условиях продажи компании BD для клиентов за пределами США при приобретении данных изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Неадекватные параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jamal S, Picker LJ, Aquino DB, McKenna RW, Dawson DB, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of peripheral T-cell neoplasms. A multiparameter flow cytometric approach. *Am J Clin Pathol.* 2001;116:512-526.

2. Uckun FM, Steinherz PG, Sather H, et al. CD2 antigen expression on leukemic cells as a predictor of event-free survival after chemotherapy for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood.* 1996;88:4288-4295.
3. Foley R, Soamboonsrup P, Carter RF, et al. CD34-positive acute promyelocytic leukemia is associated with leukocytosis, microgranular/hypogranular morphology, expression of CD2 and bcr3 isoform. *Am J Hematol.* 2001;67:34-41.
4. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
5. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry.* 1997;30:214-230.
6. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
7. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR.* 1988;37:377-388.
8. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
9. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
10. Bieber CP, Howard FD, Pennock J, Wong J, Shorthouse R, Stinson EB. Preparation, characterization, and primate testing of monoclonal antithymocyte globulin. *Transplantation.* 1981;31:283-289.
11. Howard FD, Ledbetter JA, Wong J, Bieber CP, Stinson EB, Herzenberg LA. A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation. *J Immunol.* 1981;126:2117-2122.

12. Crawford K, Gabuzda D, Pantazopoulos V, et al. Circulating CD2⁺ monocytes are dendritic cells. *J Immunol.* 1999;163:5920-5928.
13. Lanier LL, Phillips JH. A map of the cell surface antigens expressed on resting and activated human natural killer cells. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human Myeloid and Hematopoietic Cells*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;3:157-170.
14. Bierer BE, Peterson A, Gorga JC, Herrmann SH, Burakoff SJ. Synergistic T-cell activation via the physiological ligands for CD2 and the T-cell receptor. *J Exp Med.* 1988;168:1145-1156.
15. Moingeon P, Chang HC, Wallner BP, Stebbins C, Frey AZ, Reinherz EL. CD2-mediated adhesion facilitates T-lymphocyte antigen-recognition function. *Nature.* 1989;339:312-314.
16. Koyasu S, Lawton T, Novick D, et al. Role of interaction of CD2 molecules with lymphocyte function-associated antigen-3 in T-cell recognition of nominal antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:2603-2607.
17. Haynes BF. Summary of T cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:3-30.



CD38 (HB-7)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD38.

Форма	Номер по каталогу
FITC	340909
PE	345806
PE-Cy7	335825
APC	345807

10/2013

23-13704-03



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
 2350 Qume Drive
 San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
 Pottery Road, Dun Laoghaire,
 Co. Dublin, Ireland
 Tel +353.1.202.5222
 Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
 Tel +32.2.400.98.95
 Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
 4 Research Park Drive,
 Macquarie University Research Park,
 North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD38 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD38, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия CD38 в исследовании гематологической неоплазии^{1,2}

2. СОСТАВ

CD38, клон HB-7, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клеточной линией BJBAB.³ CD38 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	6 мкг в 1,0 мл PBS	6
PE	25 мкг в 2,0 мл PBS	12,5
PE-Cy7 ^{7b}	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25
APC	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25

а. Конц. = концентрация

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

- b. Су™ — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: $\leq 5\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PE-Cy7, APC: $\leq 20\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные

- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACSTM lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASHTM (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азид натрия.
- Раствор BD CellFIXTM (номер по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азид натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{4,5}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендую-

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

мое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁴.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращаясь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{6,7} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD38. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.

7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты PE-Cy7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

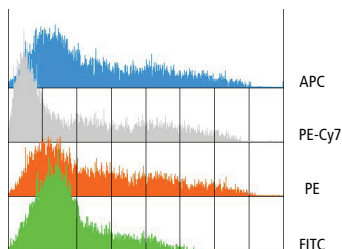
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр.⁸ Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на периферической крови и гейтированные по лимфоцитам. Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSCComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и Руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSCComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы⁹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD38 распознает интегральный мембранный гликопротеин массой 45 килодальтон (кДа) с белковой сердцевиной массой 35 кДа.¹⁰

CD38 экспрессируется почти на всех предшественниках В-лимфоцитов, плазматических клетках и тимоцитах.¹⁰ Он также

присутствует на активированных Т-лимфоцитах, естественных лимфоцитах-киллерах, миелобластах и эритробластах.^{3,10-15} Данный антиген экспрессируется на ранних стадиях дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, пропадает на промежуточных этапах созревания и затем появляется снова во время последних этапов созревания.^{3,10,16,17} Антиген CD38 экспрессируется на 90 % клеток CD34⁺; не экспрессируется на плюрипотентных стволовых клетках. Коэкспрессия антигена CD38 на клетках CD34⁺ свидетельствует о детерминации направления клеточной линии дифференцировки данных клеток.^{18,19} CD38 — контррецептор CD31.²⁰ Он также экспрессируется при Т- и В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (Т- и В-ALL), лимфоме Беркитта, множественной миеломе и остром миелоидном лейкозе (AML).^{1,2} и может служить прогностическим индикатором хронического лимфолейкоза (CLL).²¹

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD38⁺ и CD38⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD38⁺ и CD38⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD38⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD38 был представлен на рассматривание на Четвертой международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Fourth International Workshop and

Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон HB-7 в составе слепой панели антител и сообщали согласующиеся друг с другом результаты¹⁰.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI CD38⁺ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC ^c	3	1651,8	33,75	2,04
PE	25	134,9	10,43	7,73
PE-Cy7	3	226,8	6,71	2,96
APC	3	387,2	25,49	6,58

- a. N = количество образцов
- b. CV = коэффициент вариации
- c. Клетки Раджи

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). Когда популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоemий и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов⁵.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компаниями BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SE. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and

leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:1588-1592.

2. Pezzutto A, Behm F, Callard RE, et al. Flow cytometry analysis of the B-cell blind panel: joint report. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:165-174.
3. Tedder TF, Clement LT, Cooper MD. Discontinuous expression of a membrane antigen (HB-7) during B lymphocyte differentiation. *Tissue Antigens*. 1984;24:140-149.
4. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
5. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
6. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
7. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
8. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
9. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
10. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD38. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:86.
11. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood*. 1991;77:1218-1227.

12. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newslett.* 1990;10:55-61.
13. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS.* 1990;4:479-497.
14. Nicholson JKA, Jones BM. Immunophenotyping by flow cytometry: its use in HIV infection. *Labmedica.* 1989;6:21-26.
15. Terstappen LW, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol.* 1990;48:138-148.
16. Salazar-Gonzalez JE, Moody DJ, Giorgi JV, Martinez-Maza O, Mitsuyasu RT, Fahey JL. Reduced ecto-5'-nucleotidase activity and enhanced OKT10 and HLA-DR expression on CD8 (T suppressor/cytotoxic) lymphocytes in the acquired immune deficiency syndrome: evidence of CD8 cell immaturity. *J Immunol.* 1985;135:1778-1785.
17. Tedder TF, Crain MJ, Kubagawa H, Clement LT, Cooper MD. Evaluation of lymphocyte differentiation in primary and secondary immunodeficiency diseases. *J Immunol.* 1985;135:1786-1791.
18. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood.* 1991;77:1218-1227.
19. Terstappen LWMM, Huang S, Picker LJ. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood.* 1992;79:666-677.
20. Deaglio S, Morra M, Mallone R, et al. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol.* 1998;160:395-402.
21. Ghia P, Guida G, Stella S, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood.* 2003;101:1262-1269.



CD1a (SK9)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD1a

Форма **Номер по каталогу**
PE **333167**

2/2014

23-13739-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD1a предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD1a, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYS™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD1a в исследовании гематологической неоплазии¹⁻³

2. СОСТАВ

CD1a, клон SK9⁴, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей CD-1, иммунизированных тимоцитами человека. CD1a состоит из тяжелых цепей иммуноглобулина мыши IgG_{2b} и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в Табл. 1.

Табл. 1 Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
PE	25 мкг в 1,0 мл PBS	25

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- PE: ≤20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока годности, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока годности. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые полистирольные пробирки 12 x 75 мм Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (10X) (№ по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASH™ (№ по каталогу 349524) или промыочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- Раствор BD CellFIX™ (№ по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.

- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть рассмотрены до отбора образцов и анализа^{5, 6}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁵.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращаясь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{7, 8} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD1a.

Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

Аналитические результаты

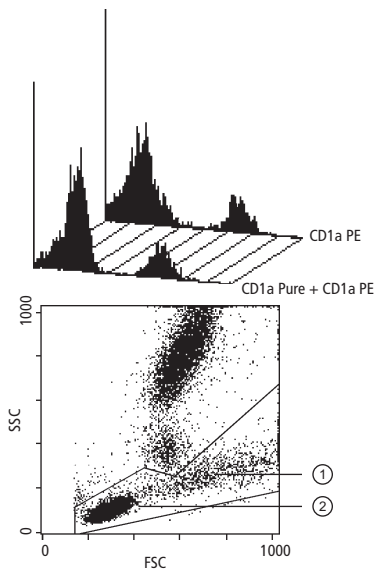
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведе-

ния надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр⁹. Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На Рис. 1 представлены репрезентативные данные, полученные на клетках цельной крови, смешанных с клетками MOLT-4 и гейтированных по фракции лимфоцитов/MOLT-4. Лазерное возбуждение при длине волны 488 нм.

Рис. 1 Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



№	Описание
1	Клетки MOLT-4
2	Лимфоциты

Внутренний контроль качества

Рекомендуется использовать гранулы BD Calibrite™ Beads и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и контроля качества системы¹⁰.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD1a распознает антиген тимоцитов человека массой 49 килодальтон (кДа), ассоциированный с $\beta 2$ -микроглобулином молекулярной массой 12 кДа^{11, 12}.

Антиген CD1a присутствует на 60–90 % тимоцитов, некоторых Т-клеточных лейкозах и лимфомах, клетках Лангерганса в коже^{13, 14} и субпопуляции дендритных клеток^{14, 15}. CD1a не реагирует с Т- и В-лимфоцитами периферической крови, моноцитами, нормальными мононуклеарными клетками костного мозга и нормальными тонзиллярными В- и Т-лимфоцитами^{11, 13}.

Чувствительность

Чувствительность определяется как степень разделения популяций CD1a⁺ и CD1a⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на смеси клеток MOLT-4 и цельной крови. Разделение CD1a⁺ и CD1a⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD1a⁺ и соответствующих отрицательных. См. Табл. 1.

Воспроизводимость

CD1a был представлен на рассмотрение на Второй международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Second International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон SK9 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты⁴.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано значение средней интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в Табл. 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные среднеквадратичные отклонения (SD) определяли по парным результатам для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку повторяемости в пределах образца.

Табл. 2 Повторяемость MFI MOLT-4 клеток CD1a⁺ по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
PE	5	480,3	151,09	31,46

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем конъюгаты с другими красителями (FITC, PerCP). Если популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся подобному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реагентов⁶.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Искключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.

Проблема	Возможная причина	Решение
Густая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством анти-тел.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен аزيد натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте аزيد натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Knowles DM. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. In: Knowles DM, Thompson DD, eds. *Neoplastic Hematopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Clin Cytometry*. 2001;46:23-27.
- Berger R, Dastugue N, Busson M, et al. t (5; 14)/HOX11L2-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia: a collaborative study of the Groupe Francais Cytogenetique Hematologique (GFCH). *Leukemia*. 2003;17:1851-1857.
- Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:3-30.

5. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
6. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
7. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
8. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
9. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
10. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
11. Boumsell L, Amiot M, Raynal B, Gay-Bellile V, Caillou B, Bernard A. Epitope groups of CD1 molecules. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:289-302.
12. Martin LH, Calabi F, Lefebvre FA, Bilsland CA, Milstein C. Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:9189.
13. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol*. 1983;131:212-216.
14. Ito T, Inaba M, Inaba K, et al. Subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol*. 1999;163:1409.
15. Ali H, Patry C, Salamero J, et al. Functional and phenotypic analysis of thymic CD34⁺ CD1a⁺ progenitor-derived dendritic cells: predominance of CD1a⁺ differentiation pathway. *J Immunol*. 1999;162:5821.



BD Oncomark™ Anti-Lambda/ Anti-Kappa/CD20

№ по каталогу 331356

2/2014

23-13750-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.bdbiosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект BD Oncomark™ Anti-Lambda FITC/Anti-Kappa PE/CD20 PerCP-Cy™5.5* предназначен для иммунофенотипирования наличия и степени клональной экспансии в В-клеточной линии дифференцировки методом проточной цитометрии in vitro. Аномальные соотношения каппа/лямбда или интенсивности сигналов весомо указывают на клональные процессы¹⁻³. Anti-Lambda/Anti-Kappa/CD20 применяются при диагностике нарушений со стороны кроветворной системы¹⁻³.

2. СОСТАВ

Anti-Lambda, клон 1-155-2, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 и клеток мышей BALB C/J, иммунизированных иммуноглобулином человека IgA₁-λ миеломным белком.

Anti-Kappa, клон TB28-2, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 и клеток мышей CB6 (BC57b x BALB/c), иммунизированных человеческим IgG-κ миеломным белком.

CD20, клон L27, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных лимфобластоидными клетками линии LB.

* Cy™ — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики in vitro. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Anti-Lambda состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких лямбда-цепей. Anti-Kappa и CD20 состоят из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Данный реагент поставляется в виде сочетания Anti-Lambda FITC, Anti-Kappa PE и CD20 PerCP-Cy5.5 в 1 мл физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS), содержащего альбумин бычьей сыворотки (BSA) и 0,1 % азида натрия.

Чистота антител следующая:

- FITC, PE, PerCP-Cy5.5: ≤20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока годности, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока годности. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые полистирольные пробирки 12 x 75 мм Falcon®† или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками

† Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (10X) (№ по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASH™ (№ по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- Раствор BD CellFIX™ (№ по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Надлежащим образом оборудованный цитометр. Лазерное возбуждение проточных цитометров должно быть установлено на 488 нм; цитометры должны быть в состоянии обнаруживать светорассеяние и соответствующую флуоресценцию; на них должно быть установлено подходящее аналитическое программное обеспечение для сбора и анализа данных. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

BD Oncomark Anti-Lambda FITC/Anti-Kappa PE/CD20 PerCP-Cy5.5 можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии периферической крови и аспиратов костного мозга, собранных в пробирки для взятия крови BD Vacutainer® с ЭДТА или аналогичные. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{4, 5}.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращаясь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{6, 7} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁴.

Во избежание сывороточной интерференции при использовании данных реагентов необходима предварительная отмывка образца с использованием не менее 25 объемов неконцентрированного PBS с 0,1 % азида натрия (т. е. 48 мл неконцентрированного PBS с азидом натрия на 2 мл цельной крови, подлежащей отмывке). Хорошо перемешайте. Осадите клетки центрифугированием и ресуспендируйте в неконцентрированном PBS с 0,1 % азида натрия до исходного объема.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark Anti-Lambda/Anti-Kappa/CD20 к 100 мкл цельной крови или предварительно профильтрованного костного мозга в 12 x 75-мм пробирке.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–20 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).

3. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C.

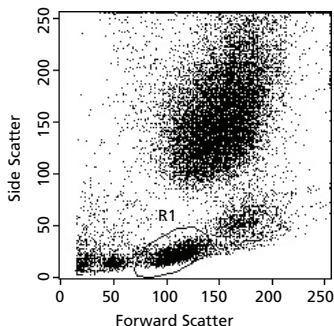
Окрашенные образцы необходимо проанализировать не позднее 24 часов после окрашивания.

Анализ методом проточной цитометрии

1. Настройте прибор согласно рекомендациям производителя.
Ежедневно измеряйте контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и контроля качества системы.
2. Тщательно встряхните клетки на мешалке «вортекс» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию, перед их обработкой на проточном цитометре⁸.
3. Измерьте образец на проточном цитометре.

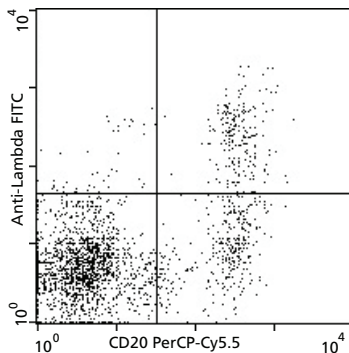
4. Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения.
5. Разместите гейт вокруг интересующей популяции на точечном графике зависимости FSC от SSC (Рис. 1).

Рис. 1 Точечный график зависимости FSC от SSC



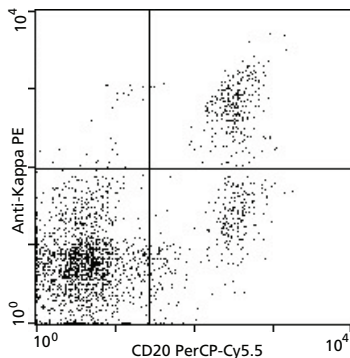
6. Проведите анализ интересующего антигена на основе эталонной отрицательной популяции.
7. Нанесите квадранты и рассчитайте статистические данные (Рис. 2, Рис. 3 и Рис. 4).

Рис. 2 Нанесенные квадранты и отображаемая статистика для гейта G1 на графике зависимости CD20 PerCP-Cy5.5 от Anti-Lambda FITC



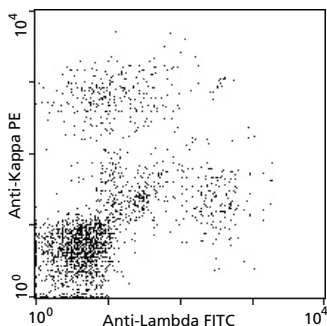
Квадрант	События	Гейтированные, %	Всего, %
I	673	2,78	0,34
II	2476	10,39	1,28
III	17 573	73,77	9,08
IV	3099	13,01	1,60

Рис. 3 Нанесенные квадранты и отображающая статистика для гейта G1 на графике зависимости CD20 PerCP-Cy5.5 от Anti-Kappa PE



Квадрант	События	Гейтированные, %	Всего, %
I	663	2,83	0,35
II	3120	13,10	1,61
III	17 512	73,51	9,05
IV	2,526	13,60	1,31

Рис. 4 График зависимости Anti-Lambda FITC от Anti-Kappa PE



7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Anti-Lambda специфичны для легких лямбда-цепей человеческих иммуноглобулинов⁹.

Anti-Kappa специфичны для легких каппа-цепей человеческих иммуноглобулинов⁹.

Антиген CD20 — это фосфопроtein с молекулярным весом 35 или 37 килодальтон (кДа), в зависимости от степени фосфорилирования¹⁰. Антиген не гликозилирован¹⁰.

Распространение антигенов

Иммуноглобулины, несущие легкие лямбда-цепи, присутствуют приблизительно на 40 % нормальных В-лимфоцитов и на неопластических клетках IgL⁺2, 3, 11–15.

Иммуноглобулины, несущие легкие каппа-цепи, присутствуют приблизительно на 60 % нормальных В-лимфоцитов и на неопластических клетках IgK⁺2, 3, 11–15.

Антиген CD20 экспрессируется на В-лимфоцитах синхронно с экспрессией поверхностного IgM.^{10, 16} Антиген присутствует на покоящихся и активированных В-лимфоцитах, но исчезает перед дифференцировкой в плазматические клетки.¹⁰ Антиген CD20 найден в зоне мантии и в герминально-центральных областях вторичных фолликулов лимфоидной ткани и может экспрессироваться на фолликулярных дендритных клетках (FDC) в герминальных центрах.¹⁰ Низкоуровневая экспрессия антигена CD20 обнаружена в субпопуляции Т-лимфоцитов.¹⁷

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Использование терапевтических моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся подобному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Использование данного сочетания реагентов при диагностической оценке нарушений со стороны кроветворной системы возможно лишь в контексте тщательного иммунофенотипического анализа, включающего другие релевантные маркеры.

Методики с использованием реагентов BD Oncomark должны придерживаться инструкций по эксплуатации конкретного прибора, программного обеспечения и методик контроля качества, принятых в вашей лаборатории.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием образцов, обработанных ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.

Проблема	Возможная причина	Решение
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weinberg DS, Pinkus GS, Ault KA. Cytofluorometric detection of B cell clonal excess: a new approach to the diagnosis of B cell lymphoma. *Blood*. 1984;63:1080-1087.
- Braylan RC, Benson NA, Iturraspe J. Analysis of lymphomas by flow cytometry: current and emerging strategies. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;677:364-378.
- Letwin BW, Wallace PK, Muirhead KA, Hensler GL, Kashatus WH, Horan PK. An improved clonal excess assay using flow cytometry and B-cell gating. *Blood*. 1990;75:1178-1185.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
- Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
- Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
- Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
- Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
- Kubagawa H, Gaithings WE, Levitt D, Kearney JF, Cooper MD. Immunoglobulin isotype expression of normal pre-B cells as determined by immunofluorescence. *J Clin Immunol*. 1982;2:264.
- Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD20. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. 1 ed. New York, NY: Oxford University Press; 1989:46-48.
- Chung J, Gong G, Huh J, Khang SK, Ro JY. Flow cytometric immunophenotyping in fine-needle aspiration of lymph nodes. *J Korean Med Sci*. 1999;14:393-400.
- Zardawi IM, Jain S, Bennett G. Flow-cytometric algorithm on fine-needle aspirates for the clinical workup of patients with lymphadenopathy. *Diagn Cytopathol*. 1998;19:274-278.
- Davidson B, Risberg B, Berner A, Smeland EB, Torlakovic E. Evaluation of lymphoid cell populations in cytology specimens using flow cytometry and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol*. 1999;8:183-188.
- Johnson A, Cavallin-Stahl E, Akerman M. Flow cytometric light chain analysis of peripheral blood lymphocytes in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*. 1985;52:159-165.
- Geary WA, Frierson HF, Innes DJ, Normansell DE. Quantitative criteria for clonality in the diagnosis of B-cell non-Hodgkin's lymphoma by flow cytometry. *Mod Pathol*. 1993;6:155-161.
- Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B-lymphocyte development. *Blood*. 1987;70:1316-1324.
- Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (Pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry*. 1993;14:196-204.



CD13 (L138)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD13

Форма	Номер по каталогу
PE	347406
PE-Cy7	338439

2/2014

23-13698-03



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD13 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD13, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия CD13 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻³

2. СОСТАВ

CD13, клон L138, получен гибридизацией клеток миеломы Sp2/0 мышей с клетками селезенки мышей гибрида BALB/c x C57BL16, иммунизированных клетками штамма KG-1a. CD13 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких kappa-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
PE	50 мкг в 2,0 мл PBS	25
PE-Cy7™ ^{7b}	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25

а. Конц. = концентрация

- b. Cy™ — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- PE, PE-Cy7: ≤ 20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Храните пузырьки с антителами в сухой среде.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ МАТЕРИАЛЫ

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- BD FACST™ lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азид натрия
- Раствор BD CellFIX™ (номер по каталогу 340181) или 1%-ный раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азид натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{4,5}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁴.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{6,7} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD13.

Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.

7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты PE-Cy7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

Аналитические результаты

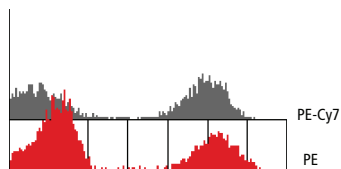
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на мешалке «вортекс» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их обработкой на проточном цитометре⁸. Перед сбором образцов отрегулируйте пороговое значение, чтобы максимально исключить клеточные обломки и убедиться, что интересующие популяции вас популяции включены. Соберите и проанализируйте данные пациентов, собранные в виде списка, с помощью соответствующего программного обеспечения. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на цельной крови и гейтированные по лимфоцитам (отрицательные) и моноцитам (положительные). Возбужде-

ние лазером проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ beads и программное обеспечение BD FACSComp™ software, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации частиц *BD Calibrite Beads* и Руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы⁹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD13 распознает аминопептидазу N, интегральный мембранный гликопротеин с одной цепью и с молекулярной массой от 150 до 170 килодальтон (кДа)^{10,11}. Аминопептидаза N, как полагают, участвует в метаболизме регуляторных пептидов на разных типах клеток, включая макрофаги, гранулоциты, эпителиальные клетки тон-

кого кишечника и почечных канальцев, а также синаптические мембраны, полученные из клеток центральной нервной системы¹¹.

Антиген CD13 экспрессируется на нейтрофилах, эозинофилах, базофилах и моноцитах периферической крови, но не на нормальных лимфоидных клетках, эритроцитах и тромбоцитах¹². CD13 является панмиелоидным маркером. Антиген CD13 экспрессируется в большинстве пациентов, страдающих на острые миелоидные лейкозы (AML)¹³. Он также может ошибочно экспрессироваться в случаях острого лимфобластного лейкоза (ALL)¹⁴⁻¹⁶.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение популяции CD13⁺ от популяции CD13⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделения CD13⁺ от CD13⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация разлива антител для каждого реагента обеспечивает оптимальную чувствительность в разделении клеток CD13⁺ относительно соответствующих отрицательных, не экспрессирующих CD13. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD13 был представлен на рассмотрение на Пятом международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон L138 (также известный как Leu-M7) в составе слепой панели антител и сообщили согласующиеся результаты¹⁷.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов.

При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI моноцитов и гранулоцитов CD13⁺ по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
PE	3	378,2	59,43	15,71
PE-Cy7	4	1361,0	202,41	14,87

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). В случае частичного перекрытия популяций, на расчет процента клеток, положительных по какому-либо маркеру, может повлиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала

влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов⁵.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в совокупности с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, с добавлением ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком высока на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством анти-тел.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Repp R, Schaeckel U, Helm G, et al. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Cytometry*. 2003;53B:11-19.
2. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of

hematologic malignancy. *Blood*. 1997;90:2863-2892.

3. Casanovas RO, Slimane FK, Garand R, et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia*. 2003;17:515-527.
4. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
5. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
6. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
7. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
8. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
9. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
10. Gadd S. Cluster report: CD13. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:782-784.
11. Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, et al. Report on the CD13 (aminopeptidase N) cluster workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:784-787.
12. Terstappen LW, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol*. 1990;48:138-148.
13. Foon KA, Todd RF III. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 1986;68:1-31.

14. Greaves MF, Chan LC, Furley AJW, Watt SM, Molgaard HV. Lineage promiscuity in hematopoietic differentiation and leukemia. *Blood*. 1986;67:1-11.
15. Greaves MF, Hariri G, Newman RA, Sutherland DR, Ritter MA, Ritz J. Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood*. 1983;61:628-639.
16. Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, et al. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1988;72:299-307.
17. Ashmun RA, Holmes KV, Shapiro LH, et al. CD13 (aminopeptidase N) cluster workshop report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:771-775.



CD15 (MMA)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD15

Форма
FITC

Номер по каталогу
332778

2/2014

23-13740-03



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Becton Dickinson Pty Ltd,
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD15 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD15, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD15 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻⁵.

2. СОСТАВ

CD15, клон MMA, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных линией гистиоцитарных клеток U-937. CD15 состоит из тяжелых цепей иммуноглобулина мыши (IgM) и легких каптацепей.

Каждый реагент поставляется в 2х растворе HEPES, содержащем желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	200 мкг в 2,0 мл HEPES	100

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухой среде.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACS™ lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разбавлению и предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промывочный фосфатный буфер (PBS), содержащий 0,1 % азида натрия
- Раствор BD CellFIX™ (номер по каталогу 340181) или 1%-ный раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида

натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.

- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{6,7}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁶.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{8,9} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

6. ПРОЦЕДУРА

ВНИМАНИЕ Не используйте хлорид аммония для лизирования эритроцитов при окрашивании CD15 FITC, клон MMA. При использовании хлорида аммония теряются гранулоциты.

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD15.

Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

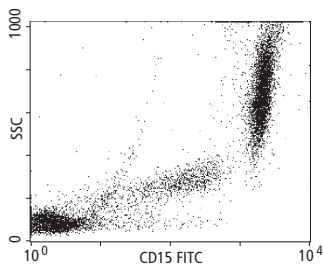
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на мешалке «вортекс» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их обработкой на проточном цитометре¹⁰. Перед сбором образцов отрегулируйте пороговое значение, чтобы максимально исключить клеточные обломки и убедиться, что интересующие популяции вас популяции включены. Соберите и проанализируйте данные пациентов, собранные в виде списка, с помощью соответствующего программного обеспечения. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на обычной периферической крови. Лазерное возбуждение при длине волны 488 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и Справочное руководство по программному обеспечению *BD FACSComp Software Reference Manual*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы¹¹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD15 распознает особую последовательность сахаров, встречающуюся в гликолипид лакто-N-фукопентоза III церамиде^{1,12}.

Антиген CD15 присутствует на поверхности более чем 95 % зрелых гранулоцитов периферической крови, в том числе эозинофилов и базофилов^{1,13} и присутствует в низкой плотности на циркулирующих моноцитах¹.

CD15 экспрессируется лишь небольшим количеством макрофагов тканей¹⁴ и отсутствует на дендритных клетках^{15,16}. CD15 отсутствует на незрелых и зрелых покоящихся В- и Т-клетках^{1,13} и NK-клетках¹ периферической крови и лимфоидной ткани. CD15⁺ клетки могут демонстрировать окрашивание цитоплазмы или мембраны. CD15 экспрессируется практически у всех пациентов с хронической гранулоцитарной лейкозией^{1,5}, а также

экспрессируется 80 % или больше лейкобластов отдельно взятого AML¹⁷. CD15 реагирует с клетками Штернберга-Рида и разновидностями лимфогранулематоза^{3,14,16}.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD15⁺ и CD15⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD15⁺ и CD15⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD15⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD15 был представлен на рассмотрении на Четвертом международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон MMA в составе слепой панели антител и сообщили согласующиеся результаты¹².

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения

объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI гранулоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№а	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	5	2 815	96,08	3,41

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). Когда популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов⁷.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связи с другими марке-

рами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.

Проблема	Возможная причина	Решение
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hanjan SN, Kearney JF, Cooper MD. A monoclonal antibody (MMA) that identifies a differentiation antigen on human myelomonocytic cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1982;23:172-188.
- Bettelheim P, Lutz D, Majdic O, et al. Cell lineage heterogeneity in blast crisis of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 1985;59:395-409.
- Arber DA, Weiss LM. CD15: a review. *Appl Immunohistochem*. 1993;1:17-30.
- Cantu-Rajoldi A, Putti C, Saitta M, et al. Coexpression of myeloid antigens in childhood acute lymphoblastic leukaemia: relationship with the stage of differentiation and clinical significance. *Br J Haematol*. 1991;79:40-43.
- Bernstein ID, Andrews RG, Cohen SF, McMaster BE. Normal and malignant human myelocytic and monocytic cells identified by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1982;128:876-881.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
- Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations

on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.

- Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
- Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
- Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
- Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
- Skubitz K, Balke J, Ball E, et al. Report on the CD15 cluster workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:800-805.
- Andrews RG, Torok-Storb B, Bernstein ID. Myeloid-associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies. *Blood*. 1983;62:124-132.
- Hsu SM, Jaffe ES. Leu-M1 and peanut agglutinin stain the neoplastic cells of Hodgkin's Disease. *Amer J Clin Pathol*. 1984;82:29-32.
- Van Voorhis WC, Steinman RM, Hair LS, et al. Specific antimononuclear phagocyte monoclonal antibodies. Application to the purification of dendritic cells and the tissue localization of macrophages. *J Exp Med*. 1983;158:126-145.
- Pinkus GS, Thomas P, Said JW. Leu-M1—A marker for Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease: an immunoperoxidase study of paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol*. 1985;119:244-252.
- Drexler HG, Sagawa K, Menon M, Minowada J. Reactivity pattern of 'myeloid monoclonal antibodies' with emphasis on MCS-2. *Leuk Res*. 1986;10:17-23.