

Набор для подсчета стволовых клеток BD Stem Cell Enumeration Kit

№ по каталогу 344563



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются
собственностью компании Becton, Dickinson and Company.
© BD, 2011 г.



12/2011

23-11445-03



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences

2350 Qume Dr.
San Jose, CA 95131 USA
Тел.: 877.232.8995
Факс: 408.954.2347
ClinicalApplications@bd.com

BD Biosciences

Служба поддержки пользователей
в Европе
Тел.: 32.2.400.98.95
Факс: 32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com



BENEX Limited

Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland
Тел.: 353.61.472920
Факс: 353.61.472907

bdbiosciences.com

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ	5
3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ.....	7
4. РЕАГЕНТЫ	7
Поставляемые реагенты	7
Меры предосторожности	9
Хранение и обращение.....	11
5. ПРИБОР	12
6. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ.....	13
Условия, мешающие проведению анализа.....	14
7. МЕТОДИКА	15
Поставляемые реагенты	15
Необходимые, но не поставляемые реагенты и материалы	15
Контроль качества	16
Краткое описание окрашивания.....	17
Окрашивание контрольных образцов и образцов для оптимизации: проточный цитометр BD FACSCanto II II Flow Cytometer	18
Окрашивание контрольных образцов: проточный цитометр BD FACSCalibur Flow Cytometer.....	18
Окрашивание клеток	19
Настройка, сбор и анализ данных	21

8. ОГРАНИЧЕНИЯ.....	22
9. ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	23
Эталонные интервалы	23
10. ЭФФЕКТИВНОСТЬ	24
Согласованность	24
Точность	33
Линейность	35
Стабильность.....	35
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА	36
СПРАВОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА	36

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор BD™ Stem Cell Enumeration (SCE) Kit позволяет выполнять одновременный подсчет жизнеспособных популяций кроветворных стволовых клеток с двойной положительной реакцией CD45⁺/CD34⁺ в абсолютном числе клеток CD34⁺ (клеток/мкл), а также процентной доли лейкоцитов CD34⁺ от общего числа жизнеспособных лейкоцитов (%CD34). С помощью этого набора можно анализировать следующие клинические образцы: обычную и мобилизованную периферическую кровь, свежие и размороженные продукты лейкофереза, свежий и размороженный костный мозг, а также свежую и размороженную пуповинную кровь. Комплект предназначен для использования с целью диагностики in vitro (IVD) на проточном цитометре BD FACSCalibur™ с использованием программного обеспечения BD CellQuest™ или BD CellQuest™ Pro либо на проточном цитометре BD FACSCanto™ II Flow Cytometer с использованием программного обеспечения BD FACSCanto™ Software.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Трансплантация кроветворных клеток-предшественников все чаще применяется при лечении заболеваний крови, злокачественных образований и генетических отклонений.¹⁻³ Клетки-предшественники довольно редки и обнаруживаются, главным образом, в костном мозге с чрезвычайно низкой концентрацией в периферической крови. Однако с появлением режимов мобилизации (Г-КСФ, ГМ-КСФ и химиотерапии), периферическая кровь стала предпочтительным источником стволовых клеток.¹⁻³

Антиген CD34 присутствует в незрелых кроветворных клетках-предшественниках и кроветворных колониеобразующих клетках костного мозга и крови, включая унипотентные и плюрипотентные клетки-предшественники.⁴

Точное определение количества клеток CD34 необходимо для протоколов дозирования, применяемых в процессе трансплантации стволовых клеток.² Ошибочно высокий результат может привести к вливанию раствора, содержащего меньшее количество клеток CD34⁺ по сравнению с рекомендуемой дозой. Подсчет популяции клеток CD34⁺ может быть также полезен во время мобилизации.

Конъюгированные с флуорохромом моноклональные антитела, направленные против молекулы CD34, можно использовать для определения клеток CD34⁺ с помощью проточной цитометрии. Применение проточной цитометрии для идентификации и подсчета клеток CD34⁺ обеспечивает быстрый, количественный и воспроизводимый метод оценки популяции клеток-предшественников.

При использовании метода проточной цитометрии для определения процентного содержания и абсолютного количества клеток CD34⁺ отмечены значительные отклонения в различных учреждениях.⁵ Для обеспечения повышенной надежности подсчета клеток CD34 за счет исключения источников погрешности рекомендуется применение протоколов подсчета абсолютного количества клеток с помощью проточного цитометра с единой платформой.⁶ В анализе с помощью набора BD Stem Cell Enumeration Kit для определения абсолютного количества клеток используются пробирки BD Trucount™ Tubes, поэтому исключены отклонения, связанные с подсчетом абсолютного количества кроветворных клеток.⁵ Подсчет популяции клеток в этом анализе происходит с использованием автоматического или ручного метода ограничения и анализа. Описание автоматического метода приводится в руководстве по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit* для проточных цитометров BD FACSCanto II Flow Cytometers. Описание ручного метода приводится в руководстве по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit* для проточных цитометров *BD FACSCalibur* Flow Cytometers. Анализ включает не содержащий фиксаторов раствор хлорида аммония для лизирования эритроцитов без отмывки и краситель жизнеспособных клеток 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для исключения мертвых клеток.

3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

Анализ одной пробирки выполняется путем окрашивания образца реагентом в отдельных пробирках BD Trucount для определения абсолютного количества.⁶ Когда образец добавляется к реагенту, отмеченные флуорохромом антитела в реагенте специфично связываются с поверхностью клетки. Кроме того, растворяется лиофилизированная таблетка в пробирке BD Trucount Tube, высвобождая известное количество флуоресцирующих гранул.

Краситель 7-AAD добавляется для оценки жизнеспособности клеток. Клетки с реакцией 7-AAD⁺ не являются жизнеспособными. Хлорид аммония добавляется для лизирования эритроцитов перед регистрацией данных образца на проточном цитометре.

Во время анализа образца рассчитывается концентрация жизнеспособных клеток CD34⁺ и CD45⁺, а также процентное содержание жизнеспособных клеток CD34⁺ в жизнеспособной популяции клеток CD45⁺.

4. РЕАГЕНТЫ

Поставляемые реагенты

Набор для подсчета стволовых клеток BD Stem Cell Enumeration Kit, достаточный для 50 тестов (если используется в соответствии с указаниями), поставляется вместе со следующими реагентами.

- Реагент стволовых клеток BD Stem Cell Reagent (CD45/CD34), поставляемый в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS), который содержит альбумин бычьей сыворотки (BSA) и 0,1 % азида натрия.

Реагент содержит CD45 флуоресцеинизотиоцианат (FITC), клон 2D1 и CD34 фикоэритрин (PE), клон 8G12.

- Реагент 7-аминоактиномицин-D (7-AAD).

7-AAD представляет собой краситель нуклеиновых кислот для выявления мертвых клеток.

- 10-кратный раствор хлорида аммония.

Раствор хлорида аммония является не содержащим фиксаторов раствором для лизирования эритроцитов.

- 50 пробирок BD Trucount Tubes.

Каждая пробирка однократного применения содержит лиофилизированный осадок флуоресцирующих гранул.

Реагент CD45 распознает антиген лейкоцитов человека с молекулярной массой от 180 до 220 килодальтон (кДа), являющийся представителем семейства общих лейкоцитарных антигенов (LCA).^{7,8} Антиген CD45 присутствует на всех человеческих лейкоцитах и слабо выражен в кроветворных клетках-предшественниках.

Реагент CD34 распознает антиген человеческой клетки-предшественника класса III (HPCA). Антиген CD34 присутствует в незрелых кроветворных клетках-предшественниках и во всех кроветворных колониеобразующих клетках костного мозга и крови, включая унипотентные и плюрипотентные клетки-предшественники.^{7,9-12}

Каждое из антител CD45 и CD34 состоит из тяжелых цепей иммуноглобулина мыши (IgG₁) и легких каппа-цепей.

С данным реагентом используются пробирки BD Trucount Tubes. Абсолютное количество клеток в исследуемой клеточной популяции можно определить путем добавления реагента и образца непосредственно в пробирку BD Trucount Tube. См. соответствующее руководство по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit*, в котором приводится описание системы BD FACSCanto II или проточного цитометра BD FACSCalibur Flow Cytometer.

Меры предосторожности

- Для использования с целью диагностики *in vitro* (IVD).
- Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.
- Реагент 7-AAD является потенциальным канцерогенным веществом. Избегайте попадания на кожу и в глаза. Следует использовать соответствующую защитную одежду, перчатки, средства защиты лица и глаз. См. инструкции по утилизации в паспорте безопасности изделия (MSDS).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ 7-AAD содержит диметилсульфоксид.

Представляет опасность при проглатывании (R22). Диметилсульфоксид легко проникает через кожу и может переносить растворенные химические вещества в организм. Избегайте попадания на кожу и в глаза. Обладает раздражающим действием на глаза, органы дыхания и кожу (R36/37/38). Не вдыхайте газы, дым, испарения или брызги (S23). Следует использовать соответствующую защитную одежду, перчатки, средства защиты лица и глаз (S36/37/39). Тщательно промойте после работы. Храните отдельно от продуктов питания, напитков и кормов для животных. Этот материал и соответствующий контейнер следует утилизировать как опасные отходы (S60).

- Реагент антител содержит в качестве консерванта азид натрия; тем не менее, следует избегать микробного загрязнения, которое может стать причиной ошибочных результатов.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Азид натрия представляет опасность при проглатывании (R22). Храните отдельно от продуктов питания, напитков и кормов для животных. Храните контейнер в плотно закрытом состоянии (S7). Не вдыхайте газы, дым, испарения или брызги (S23). Следует использовать соответствующую защитную одежду, перчатки, средства защиты лица и глаз (S36/37/39). В случае попадания в глаза следует немедленно промыть их большим количеством воды и обратиться к врачу (S26). Загрязненную одежду следует снимать немедленно (S27). При контакте с кислотами высвобождается крайне ядовитый газ (R32). Этот материал и соответствующий контейнер следует утилизировать как опасные отходы (S60). Длительный контакт с кислыми растворами и соединениями металлов может привести к образованию потенциально взрывоопасных азидов металлов. Если какой-либо из этих материалов необходимо слить в систему канализации, смывайте его большим количеством воды.

- Не дезинфицировать лизированные образцы на основе хлорида аммония с помощью отбеливателя.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Лизирующий раствор на основе хлорида аммония представляет опасность при проглатывании (R22) и раздражает глаза (R36). Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки. Утилизируйте в соответствии с федеральными, региональными или местными законами и правилами.

- **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ** Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{13,14} 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.

-
- Для достижения точного результата важно добавлять точный объем образца в пробирки BD Trucount Tubes. Пипетки должны быть откалиброваны для дозирования объема 100 мкл. Используйте методику обратного пипетирования или пипетку прямого объемного вытеснения для отбора аликвот. Дополнительную информацию см. в инструкциях производителя пипетки.
 - Заданное число гранул различается в зависимости от партии пробирок BD Trucount Tubes. Чрезвычайно важно использовать число гранул, указанное на текущей партии пробирок BD Trucount Tubes, при вводе этого значения в программное обеспечение или при выполнении подсчета абсолютного количества вручную. Не смешивайте различные партии пробирок в одном анализе.
 - Пробирки BD Trucount Tubes предназначены для использования со специальной методикой лизирования без отмывки. Не устанавливайте пороговое значение для прямого светорассеяния (FSC) при сборе данных.

Хранение и обращение

- Храните реагент BD Stem Cell Reagent (CD45/CD34) при температуре от 2 до 8 °C. Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Обеспечьте сухое состояние флаконов с реагентами.

-
- Храните пробирки BD Trucount Tubes в оригинальной упаковке (пакетах из пленки) при температуре от 2 до 25 °C. Во избежание образования конденсата открывайте пакет только после его нагрева до комнатной температуры и аккуратно снова запечатывайте пакет после извлечения пробирки. Осматривайте влагопоглотитель каждый раз при вскрытии пакета. Если цвет влагопоглотителя станет бледно-лиловым вместо голубого, утилизируйте оставшиеся пробирки. Неоткрытый пакет остается в стабильном состоянии, пока не истечет срок годности, указанный на упаковке. Не открывайте и не используйте пробирки после истечения срока годности. Используйте пробирки в течение 1 часа после их извлечения из пакета. Используйте остальные пробирки в течение 1 месяца после вскрытия пакета.
 - Храните реагент 7-AAD при температуре от 2 до 8 °C. Храните в темном месте.
 - Храните 10-кратный раствор хлорида аммония при температуре от 2 до 8 °C.

5. ПРИБОР

Набор BD Stem Cell Enumeration Kit предназначен для использования на проточном цитометре BD FACSCanto II или BD FACSCalibur Flow Cytometer.

Чтобы настроить напряжение и компенсацию флуоресценции в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), а также проверить чувствительность прибора перед сбором данных, используйте один из следующих методов.

- Для проточного цитометра BD FACSCanto II Flow Cytometer используйте гранулы BD FACST[™] 7-Color Setup Beads с клиническим программным обеспечением BD FACSCanto Clinical Software версии 2.4 для анализа. Для проведения анализа необходима дополнительная процедура оптимизации для PE- γ 7AAD. Для получения инструкций и информации о специальной настройке при проведении анализа и сбора данных см. руководство по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit* для проточных цитометров BD FACSCanto II Flow Cytometers.
- Для проточного цитометра BD FACSCalibur Flow Cytometer используйте гранулы BD Calibrite[™] 3 Beads и программное обеспечение BD FACSComp[™] Software версии 4.2–6.0, настроенное на проведение анализа с 3-х или 4-цветным лизированием без отмытки (LNW). Для анализа используйте программное обеспечение BD CellQuest (версии 3.3) или BD CellQuest Pro (версии 4.0.2, 5.2.1 или 6.0). Для получения инструкций по сбору данных и анализу см. руководство по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit* для проточных цитометров BD FACSCalibur Flow Cytometers.

Тщательно встряхните клетки на мешалке «вортекс» (при низкой скорости), чтобы ресуспендировать клетки и гранулы и снизить агрегацию перед их обработкой на проточном цитометре.¹⁵ Выполните сбор данных с помощью соответствующего программного обеспечения.

6. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

- Следуйте рекомендациям по хранению и обращению, утвержденным Институтом клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute — CLSI) (H42-A2).¹⁶
- Оптимальные условия хранения неразбавленных образцов при температуре от 2 до 8 °C.^{16,17} Лаборатории должны утвердить собственные условия хранения образцов до проведения анализа.
- Выполните окрашивание образцов в течение 24 часов после сбора.¹⁸

- Храните окрашенные образцы в воде со льдом* и выполняйте сбор данных в течение 1 часа после лизирования.
- Следующие антикоагулянты были утверждены для применения в данном анализе:
 - ЭДТА, ACD-A, гепарин и CPD.
 - Для лейкофереза с данным анализом можно также использовать смесь ACD-A, гепарина и ЭДТА.

Для каждого теста требуется не менее 100 мкл неразбавленного или разбавленного образца.

Выполните подсчет лейкоцитов (WBC) во всех образцах, подлежащих оценке. Если количество лейкоцитов выше 40×10^3 клеток/мкл, разбавьте образец в соответствии со стандартными лабораторными процедурами, используя физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS) и 0,5 % альбумина бычьей сыворотки (BSA).⁵

Разбавление выполняйте методом обратного пипетирования. Запишите и введите коэффициент разбавления для расчета окончательного результирующего количества CD34 в столбце «Dilution Factor» (Коэффициент разбавления) рабочей процедуры для клинического программного обеспечения BD FACSCanto Clinical Software с модулем BD Stem Cell Enumeration Module версии 1.0, либо в шаблоне для программного обеспечения BD CellQuest или BD CellQuest Pro. Для получения инструкций по проведению анализа и сбору данных см. соответствующее руководство по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit* для проточных цитометров BD FACSCanto II или BD FACSCalibur Flow Cytometer.

Условия, мешающие проведению анализа

Не используйте заранее стабилизированные и заготовленные образцы. Не используйте гемолизированные, свернувшиеся или слипшиеся образцы.

* Под водой со льдом подразумевается лед в небольшом количестве воды. Обеспечивает лучший контакт с пробиркой, поэтому содержимое быстро охлаждается.

7. МЕТОДИКА

Поставляемые реагенты

- Реагент BD Stem Cell Reagent (CD45 FITC/CD34 PE).
- 10-кратный раствор хлорида аммония.
- Реагент 7-AAD.
- 50 пробирок BD Trucount Tubes.

Необходимые, но не поставляемые реагенты и материалы

- Набор гранул BD FACS 7-Color Setup Bead Kit (номер по каталогу BD: 335775, включая буферный раствор для разбавления гранул BD Bead Dilution Buffer) для использования в проточном цитометре BD FACSCanto II Flow Cytometer.
- Набор гранул для 3-цветной настройки BD Calibrite 3 Three-Color Kit Beads (номер по каталогу BD: 340486) для использования в проточном цитометре BD FACSCalibur Flow Cytometer.
- Вода для анализа (деионизованная).
- Пробирки для взятия крови BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes или аналогичные с соответствующим антикоагулянтом.
- Мешалка «вортекс».
- Таймер.
- Баня со льдом.
- Полистирольные пробирки размером 12 x 75 мм BD Falcon™ Polystyrene Tubes (номер по каталогу BD: 352052 или 352058) или аналогичные.
- Калиброванная микропипетка с наконечниками для дозирования 20 мкл.
- Калиброванная микропипетка с наконечниками для дозирования 100 мкл.
- Дозатор или пипетка для дозирования 2 мл лизирующего раствора на основе хлорида аммония.

-
- Физиологический раствор с фосфатным буфером 1X PBS (модифицированный Дульбекко, pH $7,2 \pm 0,2$) с 0,5 % альбумина бычьей сыворотки (BSA)⁵, если необходимо разбавление образца.
 - Набор контрольных образцов стволовых клеток BD Stem Cell Control Kit (номер по каталогу BD: 340991).

Контроль качества

Обработайте контрольные образцы с известными низкими и высокими значениями абсолютного количества CD34⁺ для подтверждения окрашивания и целостности системы. Для этой цели рекомендуется использование набора контрольных образцов стволовых клеток BD Stem Cell Control Kit (номер по каталогу: 340991), окрашенных без добавления реагента 7-AAD. Клетки в наборе контрольных образцов стволовых клеток BD Stem Cell Control Kit являются фиксированными клетками и поэтому положительно реагируют на 7-AAD.

Краткое описание окрашивания

Подробные инструкции по окрашиванию приведены ниже после табл. 1.

Табл. 1. Краткое описание окрашивания

1. Подготовьте образец для оптимизации (только для цитометра BD FACSCanto II), контрольные образцы и клинические образцы в соответствии со следующей таблицей.						
Тип образца	Тип пробирки	Реагент (мкл)		Контрольный образец (мкл)		(мкл)
		BD Stem Cell	7-AAD	Высокая	Низкая	Клинический образец
Для оптимизации ^a	Полистирольные	20	20	по 100 каждого		—
Контрольный образец с высоким значением	BD Trucount	20	—	100	—	—
Контрольный образец с низким значением	BD Trucount	20	—	—	100	—
Клинический образец	BD Trucount	20	20	—	—	100
2. Закройте пробирки, поместите на вортекс и аккуратно встряхните. Выдержите в течение 20 минут в темном месте при комнатной температуре.						
3. Добавьте 2 мл лизирующего раствора на основе хлорида аммония 1X в каждую пробирку.						
4. Закройте пробирки, поместите на вортекс и аккуратно встряхните. Выдержите в течение 10 минут в темном месте при комнатной температуре.						
5. Немедленно поместите пробирки в воду со льдом и выполните анализ в течение 1 часа после лизирования.						

a. Только для обработки на проточном цитометре BD FACSCanto II Flow Cytometer.

Окрашивание контрольных образцов и образцов для оптимизации: проточный цитометр BD FACSCanto II II Flow Cytometer

Краткое описание процесса окрашивания см. в разделе Краткое описание окрашивания.

1. Выполните окрашивание каждого контрольного образца в пробирках BD Trucount Tubes.
2. Выполните окрашивание образца для оптимизации в полистирольной пробирке размером 12 x 75 мм BD Falcon Polystyrene Tube.
3. Выполните настройку с помощью гранул для 7-цветной настройки, а затем оптимизацию с помощью панели «BD Stem Cell» (Стволовые клетки BD).
4. Выполните сбор данных для контрольных образцов и образцов для оптимизации в течение 1 часа после лизирования и до окрашивания клинических образцов.

Убедитесь, что контрольные значения находятся в пределах, указанных в справочном листке со значениями для анализа контрольных образцов стволовых клеток BD.

Окрашивание контрольных образцов: проточный цитометр BD FACSCalibur Flow Cytometer

Краткое описание процесса окрашивания см. в разделе Краткое описание окрашивания на стр. 17.

1. Выполните окрашивание каждого контрольного образца в пробирках BD Trucount Tubes.
2. Настройте цитометр, используя гранулы BD Calibrite Beads и программное обеспечение BD FACSComp, настроенное на 3 или 4 цвета с лизированием без отмывки (LNW).
3. Как можно быстрее выполните сбор данных для контрольных образцов на проточном цитометре BD FACSCalibur Flow Cytometer.

4. После сбора данных в одну из пробирок добавьте 20 мкл реагента 7-AAD. Закройте пробирку, поместите на вортекс и аккуратно встряхните.
5. Выдержите в течение 10 минут в темном месте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
6. Немедленно поместите пробирки в воду со льдом в темное место до начала сбора данных.
7. Обработайте контрольный образец с реагентом 7-AAD на проточном цитометре BD FACSCalibur Flow Cytometer в течение 1 часа после лизирования.

Окрашивание клеток

1. Для каждого образца пациента нанесите идентификатор на пробирку BD Trucount Tube.

Примечание. Перед использованием пробирки убедитесь, что осадок гранул BD Trucount Bead находится под металлической сеточкой на дне пробирки. Если данное условие не выполнено, утилизируйте пробирку BD Trucount Tube и замените ее новой. Не переносите гранулы в другую пробирку.

2. Перенесите пипеткой 20 мкл реагента BD Stem Cell Reagent на дно пробирки.

С помощью пипетки введите реагент непосредственно над сеточкой из нержавеющей стали, находящейся в пробирке BD Trucount Tube. Не касайтесь осадка гранул.

Примечание. Всегда меняйте наконечники для каждой новой пробирки.

3. Перенесите пипеткой 20 мкл реагента 7-AAD в пробирку.
4. С помощью пипетки нанесите 100 мкл хорошо перемешанного образца на стенку пробирки непосредственно над держателем.

Примечание. Не допускайте размазывания образца по стенке пробирки. Если на стенке пробирки останется некоторое количество образца, этот остаток не будет окрашен реагентом, однако может быть ресуспендирован лизирующим раствором и поэтому может повлиять на результаты.

Точное дозирование пипеткой очень важно при использовании пробирки BD Trucount Tube. С помощью методики обратного пипетирования или пипетки прямого объемного вытеснения нанесите образец на стенку пробирки непосредственно над держателем.

Для обратного пипетирования нажмите кнопку до второй остановки. Введите пипетку в образец и отпустите кнопку. При отпускании кнопки в наконечник набирается дополнительное количество материала образца. Во время дозирования нажмите кнопку до первой остановки, чтобы вытеснить точный объем клинической пробы. При этом излишек образца остается в наконечнике.

Всегда устанавливайте новый наконечник для каждой новой пробирки. Утилизируйте наконечники в соответствующем контейнере для биологически опасных материалов.

5. Закройте каждую пробирку, поместите на вортекс и аккуратно встряхните для перемешивания содержимого.
6. Выдержите в течение 20 минут в темном месте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
7. Добавьте 2 мкл лизирующего раствора на основе хлорида аммония 1X в каждую пробирку, чтобы лизировать эритроциты.

Примечание. Ежедневно приготавливайте достаточное количество лизирующего раствора на основе хлорида аммония 1X. Чтобы его приготовить, разбавьте 1 часть раствора хлорида аммония 10X 9 частями дистиллированной воды. Храните и используйте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).

-
8. Закройте каждую пробирку, поместите на вортекс и аккуратно встряхните для перемешивания содержимого.
 9. Выдержите в течение 10 минут в темном месте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
 10. Немедленно поместите пробирки в воду со льдом в темное место до начала сбора данных.

Выполните сбор данных для образцов на проточном цитометре BD FACSCanto II или BD FACSCalibur Flow Cytometer в течение 1 часа после лизирования. Обработанные образцы могут быть в большей степени подвержены отмиранию клеток после подготовки.¹⁷

Для получения информации о настройке, сборе и об анализе данных см. руководство по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit* проточного цитометра BD FACSCanto II или BD FACSCalibur Flow Cytometer.

Настройка, сбор и анализ данных

Информацию о настройке и сборе данных на приборе BD FACSCanto II и об анализе данных с помощью программного обеспечения BD FACSCanto Clinical Software с модулем BD Stem Cell Enumeration Module версии 1.0 см. в руководстве по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit* для проточных цитометров *BD FACSCanto II Flow Cytometers*.

Информацию о настройке и сборе данных на приборе BD FACSCalibur и об анализе данных с помощью программного обеспечения BD CellQuest или BD CellQuest Pro см. в руководстве по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit* для проточных цитометров *BD FACSCalibur Flow Cytometers*.

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Для обеспечения точности определения абсолютного количества важно использовать методику обратного пипетирования или пипетку с принудительным вытеснением для добавления образца в каждую пробирку BD Trucount Tube.
- Использование неправильного числа гранул, отличного от указанного на упаковке с пробирками BD Trucount Tubes, может привести к неточности абсолютного подсчета.
- Ошибочные результаты возможны, если пробирки не будут помещены немедленно в емкость со льдом в темное место до проведения сбора данных или если образцы не будут исследованы на проточном цитометре в течение 1 часа после лизирования.
- Несоответствующее смешивание образцов приведет к неточным результатам.
- Температурные ограничения данного анализа не позволяют использовать загрузчик BD FACSTM Loader для сбора данных образцов.
- Лаборатории должны устанавливать собственные требования к жизнеспособности клеток CD34⁺ для каждого типа клинической пробы.
- На точечном графике зависимости CD34-PE от SSC может появиться полоса тромбоцитов, если исследуемые образцы были взяты с использованием гепаринового антикоагулянта. Если это происходит, см. руководство по применению набора *BD Stem Cell Enumeration Kit*, где приведена информация по устранению проблем на проточном цитометре BD FACSCanto II или BD FACSCalibur Flow Cytometer.

9. ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Тестирование эталонного интервала значений с помощью набора BD Stem Cell Enumeration Kit было проведено в лабораториях компании BD Biosciences в городе Сан-Хосе, штат Калифорния.

Эталонные интервалы

Эталонные интервалы для периферической крови были определены с использованием образцов цельной крови, полученных от лиц из групп контрольной выборки в лабораториях компании BD Biosciences в городе Сан-Хосе, штат Калифорния. Дополнительную информацию об эталонных интервалах см. в предыдущем разделе «Ограничения». Утвержденные эталонные интервалы показаны в табл. 2.

Табл. 2. Типичные эталонные интервалы у взрослых

Регистрируемые значения	n ^a	Медиана	Стандартное отклонение	95 % эталонный интервал	
				Нижнее значение (90 % доверительный предел)	Верхнее значение (90 % доверительный предел)
Абсолютное количество CD34 (клеток/мкл)	169	2,2	1,7	0,7 (0,6; 0,8)	6,9 (6,1; 7,9)
% клеток CD34	169	0,037	0,025	0,013 (0,011; 0,014)	0,11 (0,096; 0,12)

a. n=количество образцов

Для отражения потенциальных источников непостоянства результатов, таких как пол, раса, возраст пациентов и методики подготовки, лабораториям и другим пользователям рекомендуется устанавливать собственные эталонные интервалы для клеточных популяций пациентов с помощью набора BD Stem Cell Enumeration Kit.

10. ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Согласованность

Абсолютное количество клеток CD34⁺ и процентное содержание клеток CD34⁺ было определено с помощью набора BD Stem Cell Enumeration Kit на обоих проточных цитометрах: BD FACSCanto II и BD FACSCalibur Flow Cytometers, а затем сопоставлено с результатами, полученными при использовании заявленного реагента* на проточном цитометре BD FACSCanto II Flow Cytometers.

Образцы обычной и мобилизованной периферической крови, продуктов лейкофереза, пуповинной крови и костного мозга были взяты у доноров в четырех клинических лабораториях.

В табл. 3 и табл. 4 подведены итоги исследования точности набора BD Stem Cell Enumeration Kit на проточных цитометрах BD FACSCanto II и BD FACSCalibur Flow Cytometers, соответственно. Для каждого оцениваемого образца были рассчитаны различия (отклонения) между значениями исследуемой и предикатной систем для абсолютного количества жизнеспособных клеток CD34 и процента жизнеспособных клеток CD34 в CD45. Результаты были объединены для расчета средних отклонений CD34 и %CD34 для каждого контейнера при доверительном интервале (ДИ) 95 %.

* Реагенты Beckman Coulter® Stem-Kit™ Reagents

Табл. 3. Результаты исследования точности набора BD Stem Cell Enumeration Kit на проточном цитометре BD FACSCanto II Flow Cytometer в сравнении с предикатным методом

Переменные	Контейнер	N	Абсолютное отклонение		Относительное отклонение от предиката	
			Среднее абсолютное отклонение	ДИ 95 %	Среднее относительное отклонение	ДИ 95 %
Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	Низкий	167	–0,1	(–0,5; 0,3)	Н/Д	Н/Д
	Средний	496	–0,7	(–1,4; –0,04)	–1,6	(–3,1; –0,2)
	Высокий	255	–1,4	(–4,3; 1,6)	–1,0	(–2,4; 0,4)
% CD34 в CD45	Низкий	512	–0,004	(–0,01; 0,0002)	–2,2	(–4,4; 0,1)
	Высокий	406	0,08	(0,04; 0,1)	2,1	(–0,1; 4,3)

Табл. 4. Результаты исследования точности набора BD Stem Cell Enumeration Kit на проточном цитометре BD FACSCalibur Flow Cytometer в сравнении с предикатным методом

Переменные	Контейнер	N	Абсолютное отклонение		Относительное отклонение от предиката	
			Среднее абсолютное отклонение	ДИ 95 %	Среднее относительное отклонение	ДИ 95 %
Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	Низкий	156	–0,2	(–0,4; –0,05)	Н/Д	Н/Д
	Средний	492	–0,5	(–1,3; 0,2)	–0,9	(–2,3; 0,5)
	Высокий	257	–3,6	(–6,8; –0,3)	–1,7	(–3,1; –0,2)
% CD34 в CD45	Низкий	487	–0,002	(–0,01; 0,001)	–0,8	(–3,0; 1,3)
	Высокий	418	0,2	(0,09; 0,2)	3,2	(0,9; 5,5)

Графики регрессии и статистические данные для жизнеспособных клеток CD34 и %CD34 в CD45, обнаруженных с помощью проточного цитометра BD FACSCanto II Flow Cytometer показаны на Рис. 1 и Рис. 3. Графики регрессии и статистические данные для жизнеспособных клеток CD34 и %CD34 в CD45, обнаруженных с помощью проточного цитометра BD FACSCalibur Flow Cytometer показаны на Рис. 2 и Рис. 4. Сплошная линия на каждом из графиков является линией регрессии. Пунктирная линия на каждом из графиков является линией тождества, когда заявленные результаты равны результатам при использовании набора для подсчета стволовых клеток BD Stem Cell Enumeration Kit.

Рис. 1 График регрессии для всех типов образцов (проточный цитометр BD FACSCanto II Flow Cytometer)

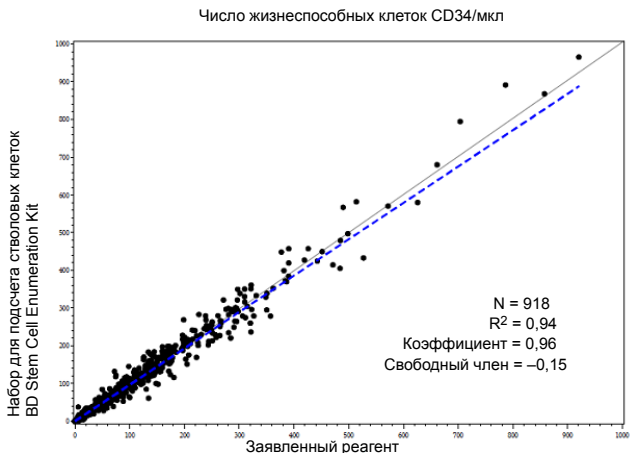


Рис. 2 График регрессии для всех типов образцов (проточный цитометр BD FACSCalibur Flow Cytometer)

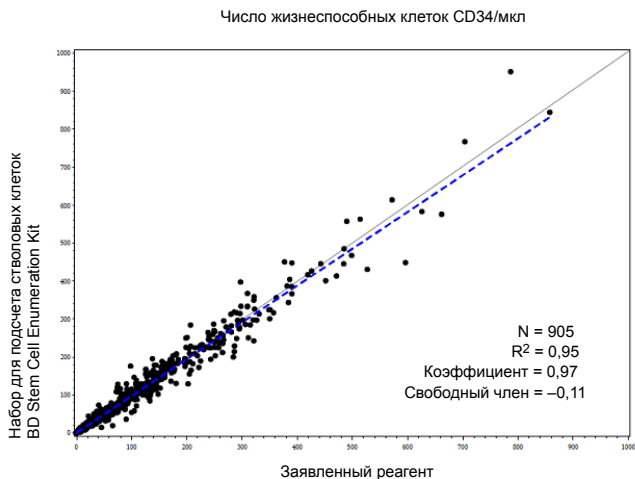


Рис. 3 График регрессии для всех типов образцов (проточный цитометр BD FACSCanto II Flow Cytometer)

% CD34 в CD45

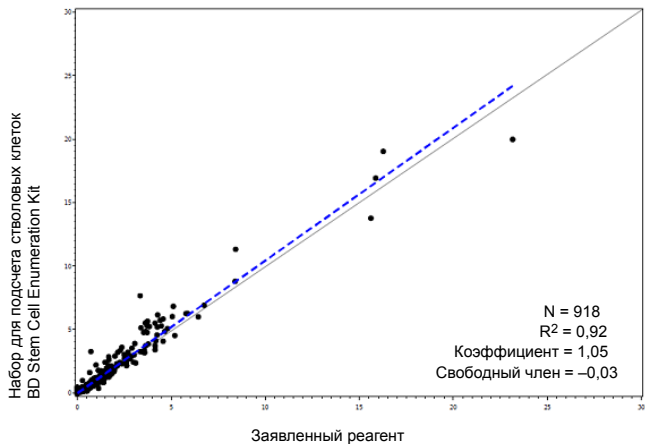
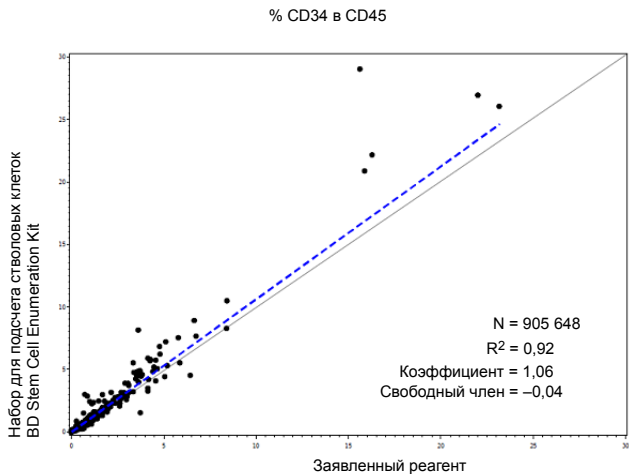


Рис. 4 График регрессии для всех типов образцов (проточный цитометр BD FACSCalibur Flow Cytometer)



В табл. 5 и табл. 6 подведена статистика регрессии анализа для каждого типа образцов, обработанного на проточных цитометрах BD FACSCanto II и BD FACSCalibur Flow Cytometers.

Табл. 5. Статистика регрессии для BD FACSCanto II по типам образцов

Тип образца	Переменная	N	R ²	Коэффициент	Свободный член
Периферическая кровь	Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	188 (нормальная: 57, мобилизованная: 131)	0,94	0,96 (0,93; 0,99)	-0,07 (-0,21; 0,07)
	% CD34 в CD45	188 (нормальная: 57, мобилизованная: 131)	0,98	0,99 (0,93; 1,06)	0,00 (-0,01; 0,00)
Лейкоферез	Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	341 (свежая: 232, замороженная: 109)	0,97	0,96 (0,94; 0,98)	-0,02 (-0,2; 0,17)
	% CD34 в CD45	341 (свежая: 232, замороженная: 109)	0,95	0,96 (0,94; 0,99)	-0,02 (-0,03; 0,00)
Пуповинная кровь	Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	241 (свежая: 124, замороженная: 117)	0,88	0,97 (0,93; 1,02)	-0,52 (-0,92; -0,11)
	% CD34 в CD45	241 (свежая: 124, замороженная: 117)	0,87	1,02 (0,94; 1,09)	-0,02 (-0,04; 0,01)
Костный мозг	Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	148 (свежая: 75, замороженная: 73)	0,95	1,00 (0,96; 1,03)	-0,02 (-0,13; 0,10)
	% CD34 в CD45	148 (свежая: 75, замороженная: 73)	0,89	1,21 (1,13; 1,28)	-0,05 (-0,10; 0,00)

Табл. 6. Статистика регрессии для BD FACSCalibur по типам образцов

Тип образца	Переменная	N	R ²	Коэффициент	Свободный член
Периферическая кровь	Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	167 (нормальная: 52, мобилизованная: 115)	0,94	1,00 (0,96; 1,03)	-0,13 (-0,32; 0,05)
	% CD34 в CD45	167 (нормальная: 52, мобилизованная: 115)	0,97	0,97 (0,9; 1,05)	0,00 (-0,01; 0,01)
Лейкофerez	Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	342 (свежая: 232, замороженная: 110)	0,97	0,98 (0,96; 0,99)	0,04 (-0,06; 0,15)
	% CD34 в CD45	342 (свежая: 232, замороженная: 110)	0,96	0,98 (0,96; 1,00)	-0,02 (-0,03; 0,00)
Пуповинная кровь	Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	245 (свежая: 122, замороженная: 123)	0,94	0,96 (0,93; 0,99)	-0,28 (-0,52; -0,04)
	% CD34 в CD45	245 (свежая: 122, замороженная: 123)	0,87	1,02 (0,92; 1,11)	-0,02 (-0,05; 0,02)
Костный мозг	Viable CD34 (Жизнеспособные клетки CD34)	151 (свежая: 73, замороженная: 78)	0,94	0,96 (0,92; 1,00)	-0,03 (-0,09; 0,03)
	% CD34 в CD45	151 (свежая: 73, замороженная: 78)	0,88	1,23 (1,15; 1,31)	-0,08 (-0,12; -0,03)

Точность

Оценки точности анализа были проведены в компании BD Biosciences с помощью контрольных образцов BD SCE Control High (с диапазоном от >10 до ≤ 100 клеток/мкл) и BD SCE Control Custom Low (с диапазоном ≤ 10 клеток/мкл), окрашенных в двух экземплярах с помощью набора BD Stem Cell Enumeration Kit и исследованных на проточных цитометрах BD FACSCanto II и BD FACSCalibur Flow Cytometers. Анализ двух отдельных серий проводился каждый день в течение 21 дня. Средние значения, стандартные отклонения и коэффициенты вариации представлены для точности результатов в пределах серии измерений и общей системной точности в табл. 7–табл. 10.

Табл. 7. Точность результатов в пределах серии измерений абсолютного количества CD34⁺ (клеток/мкл)

Контрольный образец/ цитометр	Среднее количество (клеток/мкл)	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (%)
BD SCE Control High на цитометре BD FACSCanto II	35,3	1,83	5,2
BD SCE Control High на цитометре BD FACSCalibur	35,5	1,69	4,8
BD SCE Control Custom Low на цитометре BD FACSCanto II	8,8	0,90	10,3
BD SCE Control Custom Low на цитометре BD FACSCalibur	8,8	0,75	8,6

Табл. 8. Точность в пределах серии измерений %CD34⁺

Контрольный образец/ цитометр	Среднее количество (%)	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (%)
BD SCE Control High на цитометре BD FACSCanto II	0,58	0,03	4,7
BD SCE Control High на цитометре BD FACSCalibur	0,58	0,03	4,7
BD SCE Control Custom Low на цитометре BD FACSCanto II	0,15	0,01	9,6
BD SCE Control Custom Low на цитометре BD FACSCalibur	0,14	0,01	8,2

Табл. 9. Общая системная точность измерений абсолютного количества CD34⁺
(клеток/мкл)

Контрольный образец/ цитометр	Среднее количество (клеток/мкл)	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (%)
BD SCE Control High на цитометре BD FACSCanto II	35,3	1,83	5,2
BD SCE Control High на цитометре BD FACSCalibur	35,5	2,02	5,7
BD SCE Control Custom Low на цитометре BD FACSCanto II	8,8	0,95	10,8
BD SCE Control Custom Low на цитометре BD FACSCalibur	8,8	0,82	9,3

Табл. 10. Общая системная точность %CD34⁺

Контрольный образец/ цитометр	Среднее количество (%)	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (%)
BD SCE Control High на цитометре BD FACSCanto II	0,58	0,03	4,7
BD SCE Control High на цитометре BD FACSCalibur	0,58	0,03	5,1
BD SCE Control Custom Low на цитометре BD FACSCanto II	0,15	0,01	10,2
BD SCE Control Custom Low на цитометре BD FACSCalibur	0,14	0,01	9,4

Линейность

Оценка линейности была проведена компанией BD Biosciences. Тройные измерения различных концентраций замороженных очищенных клеток CD34⁺, введенных в обычную кровь, были выполнены по всему регистрируемому диапазону анализа для подсчета абсолютного количества CD34⁺ на приборах BD FACSCanto II и BD FACSCalibur. Нижний диапазон = 0–100 клеток/мкл и общий диапазон = 0–1000 клеток/мкл. Согласно наблюдениям результаты остаются линейными во всем диапазоне абсолютного количества CD34⁺.

Стабильность

В одной клинической лаборатории было проведено исследование с целью оценки стабильности окрашенного образца набора BD Stem Cell Enumeration Kit с использованием образцов лейкофереза. Были измерены следующие показатели:

- изменения, связанные с хранением цельной крови до окрашивания;
- изменения, происходящие за промежуток времени между окрашиванием и сбором данных;
- объединенный эффект этих двух факторов.

Все образцы перед окрашиванием выдерживались при температуре от 2 до 8 °C. На основе результатов исследования с использованием образцов лейкофереза рекомендуется проводить окрашивание образцов в течение 24 часов после сбора, хранить окрашенные образцы в воде со льдом и анализировать окрашенные образцы в течение 1 часа после лизирования.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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.

СПРАВОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI, et al. Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: influence of CD34-positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol.* 1994;12:28-36.
- 2 Langenmayer I, Weaver C, Buckner CD, et al. Engraftment of patients with lymphoid malignancies transplanted with autologous bone marrow, peripheral blood stem cells or both. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15:241-246.
- 3 Zander AR, Lyding J, Bielack S. Transplantation with blood stem cells. *Blood Cells.* 1991;17:301-309.
- 4 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.* New York, NY: Oxford University Press; 1995;1:840-846.
- 5 Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. *J Hematotherapy.* 1996;5:213-226.

-
- 6 Brocklebank AM, Sparrow RL. Enumeration of CD34⁺ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*. 2001;46:254-261.
 - 7 Schwitzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
 - 8 Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
 - 9 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.
 - 10 Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133:157-165.
 - 11 Siena S, Bregni M, Brando B, et al. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood*. 1991;77:400-409.
 - 12 Civin CI, Trischmann TM, Fackler MJ, et al. Report on the CD34 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; 1989:818-825.
 - 13 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections—Third Edition; Approved Guideline*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
 - 14 Центры по контролю заболеваемости. 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.
 - 15 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.
 - 16 *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.
 - 17 Antonenas V, Garvin F, Webb M, Sartor M, Bradstock KF, Gottlieb D. Fresh PBSC harvests, but not BM, show temperature-related loss of CD34 viability during storage and transport. *Cytotherapy*. 2006;8:158-165.
 - 18 Keeney M, Brown W, Gratama J, Papa S, Lanza F, Sutherland DR. Single platform enumeration of viable CD34^{pos} cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2003;17:247-253.