



ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO



Спецификации готового к использованию лизирующего реагента VersaLyse	
Состояние	Жидкость
Объем	100 мл
Количество флаконов	1 флакон
Объем для одного исследования	1 мл (реагент готов к использованию при подготовке проб без одновременной фиксации)

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный реагент предназначен для лизиса эритроцитов при подготовке биологических образцов к цитометрическому анализу. Реагент может использоваться для анализа на цитометрах всех типов со стадией отмывки образца или без стадии отмывки после инкубации при условии использования надлежащим образом откалиброванных флуоресцирующих антител. VersaLyse также позволяет работать с образцами даже в том случае, если отмывка была выполнена на ранних стадиях подготовки, например, с целью удаления сывороточных иммуноглобулинов.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Смесь образца, содержащего эритроциты, и реагента VersaLyse инкубируется по меньшей мере 10 минут. Основной активный компонент VersaLyse - циклический амин, который под действием карбоангидразы, присутствующей в эритроцитах, трансформируется в вещество, оказывающее сильное литическое действие на эти клетки.

Данный реагент используется совместно с конъюгатами специфических антител, способными связываться с лейкоцитарными антигенными детерминантами. При инкубации образца с данными антителами происходит окрашивание лейкоцитов. Затем выполняется лизис эритроцитов. Интактные лейкоциты анализируются на проточном цитофлуориметре.

Подготовленный образец необходимо хранить при температуре 2 – 8°C. Анализ с помощью проточного цитофлуориметра следует выполнять вскоре после подготовки. При задержке анализа на несколько часов образцы необходимо обработать фиксирующим раствором - PBS с 0.1 % формальдегидом (инструкции по приготовлению см. в руководстве к фиксирующему раствору IOTest[®]3 Fixative Solution, кат. № A07800). В этом случае необходимо выполнить предварительную отмывку.

Проточный цитометр измеряет светорассеяние и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить интересующую популяцию на диаграмме, отображающей светорассеяние в боковом направлении (Side Scatter или SS) и светорассеяние в прямом направлении под малыми углами (Forward Scatter или FS). Для выбора анализируемых популяций в различных приложениях можно использовать другие двухпараметровые диаграммы.

Прибор выполняет анализ флуоресценции выбранной популяции, распознавая окрашенные и неокрашенные клетки. Результат представляется в виде процентного содержания положительных клеток от всех клеток выбранной популяции.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагент VersaLyse хранится при температуре 18 – 25°C. Если реагент хранился в холодильнике, его температуру необходимо довести до комнатной (18 – 25°C) и перед использованием выдержать по крайней мере в течение часа.

Стабильность нераспечатанного реагента приводится на этикетке флакона.

Стабильность распечатанного реагента 90 дней.

ВНИМАНИЕ

1. Не используйте реагент с истекшим сроком годности.
2. Не храните в холодильнике и не замораживайте реагент.
3. Воздействие света в ходе инкубации необходимо свести к минимуму.
4. Избегайте контаминации микроорганизмами, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
5. Формальдегид - токсичное и аллергенное вещество, потенциальный канцероген. Никогда не отбирайте его через пипетку ртом, не допускайте контакта с кожей, слизистой оболочкой, глазами, попадания на одежду.
6. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные. При работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности (в частности, использовать защитные перчатки, халат и очки).
7. После завершения работы пробирки с кровью и все одноразовые материалы необходимо поместить в специальные контейнеры для утилизации.

ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отобрать в стерильные пробирки с солью EDTA в качестве антикоагулянта.

ЗАМЕЧАНИЕ: Внимательно изучите условия использования других антикоагулянтов в разделе "АНТИКОАГУЛЯНТЫ".

Образцы должны храниться при комнатной температуре (18 – 25°C). Встряхивание образцов не допускается. Перед отбором аликвоты образец следует гомогенизировать, аккуратно перемешав.

Анализ образцов необходимо выполнить в течение 24 часов после отбора.

ОТМЫВКА ОБРАЗЦОВ

Если вы хотите отмыть образцы перед лизисом эритроцитов и последующим окрашиванием, необходимо тщательно удалить весь супернатант при последнем центрифугировании. Остатки буфера для отмывки могут снизить эффективность реагента VersaLyse.

МЕТОДИКА

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Пробирки и материалы для отбора проб.
- Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками на 10, 20, 100 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные частицы: флуоросферы Flow-Set[™] (кат. № 6607007).
- Специфические флуоресцирующие антитела.
- Изотипические контроли.
- Буфер (PBS: 0.01 М фосфат натрия; 0.145 М хлорид натрия; pH 7.2).
- Реагент для фиксации. Например: IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800).
- Центрифуга.
- Миксер (вортекс).
- Проточный цитофлуориметр.

ПОДГОТОВКА ПРОБ

Концентрация лейкоцитов в образце должна быть меньше 10^4 клеток/мкл ($10^{10}/л$). При необходимости разведите образец PBS до концентрации лейкоцитов 5×10^3 / мкл ($5 \times 10^9/л$).

Концентрация эритроцитов в образце должна быть меньше 6×10^6 /мкл ($6 \times 10^{12}/л$). Рекомендуется развести образец PBS до концентрации эритроцитов 5×10^6 /мкл.

При коррекции концентрации как лейкоцитов, так и эритроцитов необходимо использовать большее разведение. Для анализа в пробирку отбирается 100 мкл как разведенного, так и неразведенного образца.

ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ ПРОБ

ЗАМЕЧАНИЕ: Приведенная ниже процедура пригодна для стандартных исследований. При выполнении некоторых приложений Beckman Coulter объем образца и/или реагента VersaLyse может отличаться. В этом случае следуйте указаниям руководства для конкретного приложения.

А – Процедура без одновременной фиксации

Подготовка реагента

Подготовка не требуется. Используйте раствор VersaLyse непосредственно из флакона.

При исследовании любого образца необходимо также проанализировать контрольный образец (исследуемый образец плюс изотипический контроль, соответствующий специфическому окрашиванию).

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте рекомендованное производителем количество конъюгатов антител, необходимых для окрашивания 5×10^5 лейкоцитов.
2. В пробирки для анализа контролей добавьте рекомендованный производителем объем изотипического контроля, необходимый для окрашивания 5×10^5 лейкоцитов.
3. В пробирки для анализа образцов и для анализа изотипических контролей добавьте по 100 мкл образца (разведенного или неразведенного). Аккуратно перемешайте на вортексе.
4. Инкубируйте в соответствии с указаниями инструкции к используемым антителам.
5. Добавьте 1 мл реагента VersaLyse и немедленно перемешайте на вортексе в течение 1 секунды.
6. Инкубируйте по меньшей мере 10 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
При выполнении процедуры без отмывки образцы можно анализировать.
ЗАМЕЧАНИЕ: Если необходимо выполнить отмывку, не проводите анализ до тех пор, пока не выполните шаги 7 – 11.
7. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 150 x g при комнатной температуре.
8. Удалите супернатант аспирацией.
9. Ресуспенсируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
10. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 150 x g при комнатной температуре.
11. Удалите супернатант аспирацией и ресуспенсируйте клетки:

- в 0.5 или 1 мл PBS с 0.1% раствором формальдегида, если подготовленная проба будет храниться от 2 до 24 часов. (Данный раствор можно получить разведением 12.5 мкл реагента IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800) в 10-кратной концентрации в 1 мл PBS.)
- в 0.5 или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

ЗАМЕЧАНИЕ: Независимо от способа подготовки, подготовленные пробы необходимо хранить при температуре 2 - 8°C в защищенном от света месте.

В – Процедура с одновременной фиксацией

Подготовка реагента

Непосредственно перед использованием приготовьте раствор для фиксации и лизиса. Для этого к 1 мл реагента VersaLyse добавьте 25 мкл **НЕРАЗВЕДЕННОГО** фиксирующего раствора IOTest 3 10X* Fixative Solution (кат. № A07800). Перемешайте на вортексе в течение 3 - 5 секунд.

(*) ЗАМЕЧАНИЕ: в данной смеси фиксирующий раствор IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800) используется в сорокакратной, а не в номинальной десятикратной концентрации.

Подготовьте достаточный объем раствора для фиксации и лизиса в зависимости от количества образцов, предназначенных для лизиса (на 1 пробирку - 1 мл смеси).

При исследовании любого образца необходимо также проанализировать контрольный образец (исследуемый образец плюс изотипический контроль, соответствующий специфическому окрашиванию).

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте рекомендованное производителем количество конъюгатов антител, необходимых для окрашивания 5×10^5 лейкоцитов.
2. В пробирки для анализа контролей добавьте рекомендованный производителем объем изотипического контроля, необходимый для окрашивания 5×10^5 лейкоцитов.
3. В пробирки для анализа образцов и для анализа изотипических контролей добавьте по 100 мкл образца (разведенного или неразведенного). Аккуратно перемешайте на вортексе.
4. Инкубируйте в соответствии с указаниями инструкции к используемым антителам.
5. Добавьте 1 мл раствора для фиксации и лизиса и немедленно перемешайте на вортексе в течение 1 секунды.
6. Инкубируйте по меньшей мере 10 минут при комнатной температуре (18 - 25°C) в защищенном от света месте.

При выполнении процедуры без отмывки образцы можно анализировать.

ЗАМЕЧАНИЕ: Если необходимо выполнить отмывку, не проводите анализ до тех пор, пока не выполните шаги 7 - 11.

7. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при $150 \times g$ при комнатной температуре.
8. Удалите супернатант аспирацией.
9. Ресуспендируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
10. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при $150 \times g$ при комнатной температуре.
11. Удалите супернатант аспирацией и ресуспендируйте клетки в 0.5 или 1 мл PBS с 0.1% раствором формальдегида, если подготовленная проба будет храниться от 2 до 24 часов. (Данный раствор можно получить разведением 12.5 мкл реагента IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800) в 10-кратной концентрации в 1 мл PBS.)

Подготовленные пробы могут храниться в течение 24 часов при температуре 2 - 8°C в защищенном от света месте.

АНТИКОАГУЛЯНТЫ

Наилучшие результаты, независимо от методики, с отмывкой или без отмывки после лизиса, дает использование трикалиевой соли ЭДТА (K_3EDTA).

Цитрат декстрозы (ACD) и гепарин дают хорошие результаты при использовании любой процедуры подготовки за исключением подготовки без одновременной фиксации с последующей отмывкой. Для этих антикоагулянтов рекомендуется использовать процедуру с одновременной фиксацией и отмывкой.

ВЫПОЛНЕНИЕ АНАЛИЗА

При использовании реагента VersaLyse остатки эритроцитов могут давать увеличение светорассеяния в прямом направлении (FS) под малыми углами больше, чем при использовании других коммерческих лизирующих реагентов. В результате, стандартная настройка "порогового" дискриминатора может оказаться слишком низкой.

Поэтому рекомендуется настроить цитометр при первом считывании данных типичного образца. Например, при анализе лизированного образца цельной крови рекомендуется постепенно увеличивать значение дискриминатора до тех пор, пока популяция лейкоцитов не станет видимой на диаграмме FS - SS; затем необходимо аккуратно отрегулировать усиление сигналов FS и SS так, чтобы получить распределения популяций лейкоцитов, идентичные представленным на рисунках 1, 2 и 3.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ЧИСТОТА И ВЫХОД ЛИМФОЦИТОВ

Чистота и выход лимфоцитов оценивались в соответствии с рекомендациями Центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) (1). Образцы крови 10 здоровых доноров были отобраны с использованием K_2EDTA и помечены смесью моноклональных антител CD45-FITC и CD14-PE. В следующих таблицах приводятся средние значения выхода и чистоты, а также диапазоны значений для различных процедур подготовки проб:

Без отмывки			
Без одновременной фиксации		С одновременной фиксацией	
Выход	Чистота	Выход	Чистота
96.4	92.3	96.6	91.6
95 / 97.5	90.1 / 94.3	95.4 / 98.1	90.1 / 92.6

С отмывкой			
Без одновременной фиксации		С одновременной фиксацией	
Выход	Чистота	Выход	Чистота
95.6	94.0	96.2	97.2
95 / 97.3	90.3 / 97.3	95.4 / 97.5	92.7 / 99.4

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитометре определялось процентное содержание CD3+ лимфоцитов (в цельной крови здорового донора). Измерение выполнялось 31 раз. При лизисе использовалась одновременная фиксация, отмывка не выполнялась. Полученные результаты суммированы в следующей таблице:

Цельная кровь	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD3+ лимфоциты	31	60.72	1.61	2.7

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на двух цитометрах двумя лаборантами определялось процентное содержание CD3+ лимфоцитов в одном образце (цельная кровь здорового донора). Измерение выполнялось 31 раз. При лизисе использовалась одновременная фиксация, отмывка не выполнялась. Полученные результаты суммированы в следующих таблицах:

Цитометр # 1

Цельная кровь	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD3+ лимфоциты	31	60.72	1.61	2.7

Цитометр # 2

Цельная кровь	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD3+ лимфоциты	31	60.2	1.45	2.4

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном расположении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и следовать нормам лабораторной работы.
3. При гиперлейкоцитозе разведите образец PBS так, чтобы получить концентрацию лейкоцитов 5×10^9 /л.
4. При полиглобулинемии разведите образец PBS так, чтобы получить концентрацию эритроцитов 5×10^{12} /л.
5. Перед использованием необходимо довести температуру реагента VersaLyse до комнатной (18 - 25 °C).
6. Визуально проверьте эффективность лизиса. Если образцы мутные, а также в том случае, если на диаграмме светорассеяния заметно необычное распределение, возможно, произошел неполный лизис.
7. Эритроциты могут лизироваться не полностью и появляться на диаграмме светорассеяния в зоне лейкоцитов.
8. Ацетазоламид, ингибитор карбоангидразы может полностью ингибировать действие VersaLyse.
9. При некоторых заболеваниях, таких как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатии, лизис эритроцитов может происходить медленно, не полностью или совсем не происходить. В этом случае перед окрашиванием рекомендуется выделить моноклеточные клетки в градиенте плотности (например, фикола).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В приложении приводится список литературы и примеры диаграмм.

ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER, EPICS, EXPO, Flow-Set, IOTest, System II, XL, Cytomics являются зарегистрированными торговыми знаками компании Beckman Coulter Inc.

FACSCalibur является зарегистрированным торговым знаком компании BD Biosciences and Company.

ИЗГОТОВЛЕНО:

IMMUNOTECH S.A.
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 - 13276 Marseille Cedex 9
France

Отдел по работе с клиентами: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com



ПРИМЕРЫ ДИАГРАММ

Ниже показаны двухпараметровые диаграммы (светорассеяние в прямом направлении – светорассеяние в боковом направлении), полученные при анализе образца нормальной цельной крови, лизированного с помощью реагента VersaLyse (кат. № A09777). Лизис проводился без одновременной фиксации и без отмывки.

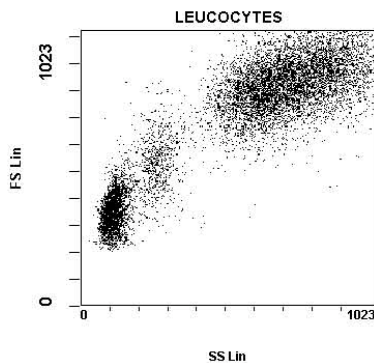


Диаграмма 1. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра BECKMAN COULTER® CYTOMICS™ FC 500, анализ выполнен в программном обеспечении CYTOMICS™ RXP Analysis.

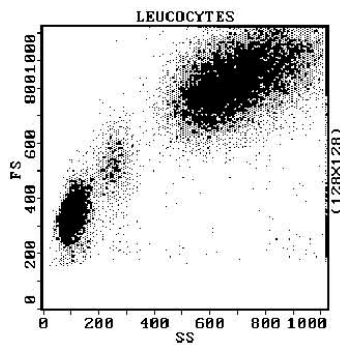


Диаграмма 2. Считывание и анализ данных выполнены с помощью проточного цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ в программном обеспечении System II™. Анализ выполнен в программном обеспечении EXPO™ Cytometer (кат. № 6605434).

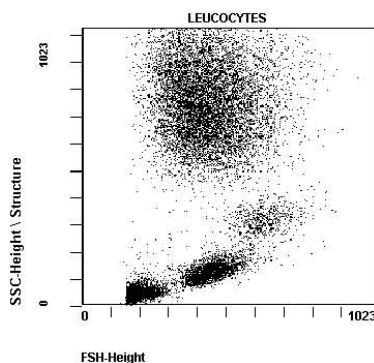


Диаграмма 3. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра BD Biosciences FACSCalibur™. Анализ выполнен в программном обеспечении EXPO™ Cytometer (кат. № 6605434).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nicholson, J.K.A., Hearn, T.L., Cross, G.D., White, M.D., "1997 revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV)", 1997, MMWR 46, RR-21-29.
2. Ashmore, L.M., Shopp, G.M., Edwards, B.S., "Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage", 1989, J. Immunol. Methods, 118, 209-215.
3. Macey, M.G., McCarthy, D.A., Milne, T., Cavenagh, J.D., Newland, A.C., "Comparative study of five commercial reagents for preparing normal and leukaemic lymphocytes for immunophenotypic analysis by flow cytometry", 1999, Communications Clinical Cytometry, 38, 153-160.
4. Macey, M.G., McCarthy, D.A., van Agthoven, A., Newland, A.C., "How should CD34+ cells be analysed? A study of three classes of antibody and five leucocyte preparation procedures", J. Immunol. Methods, 204, 175-188.
5. Vuorte, J., Jansson, S-E., Repo, H., "Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay", 2001, Cytometry, 43, 290-296.