



Stem-Kit™ Reagents

REF IM3630 50 tests

TABLE OF CONTENTS

English	2
Français	14
Deutsch	27
Italiano	40
Español	53
Português (Portugal)	66
Dansk	79
Svenska	91
Norsk	103
Ελληνικά	115
Magyar	129
Polski	142
Čeština	155
Türkçe	168
Русский	180
eesti keel	194
Română	206
APPENDIX	218
REFERENCES	230

Stem-Kit™ Reagents

REF IM3630 50 tests

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

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

Refer to this Stem-Kit Reagents package insert for complete instructions if using the manual method. Refer to the stemONETM System Guide or the stemCXP System Guide provided with the stemONE System Software (Ref. 6915452) or stemCXP System Software (Ref. 628843) respectively, for complete instructions if using the automated method.

SUMMARY

Hematopoietic Progenitor Cells (HPC)

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

CD34

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

CD45

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

7-AAD

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

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

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

Flow Cytometer Systems

Flow cytometer systems (XL, FC500, or equivalent) apply the principles of flow cytometry to analyze biological specimens in order to identify various cell populations determined by the specific monoclonal antibodies and fluorochromes used. The present test uses COULTER®EPICS® XL™/XL-MCL™ flow cytometer systems equipped with System II™ Software (Version 3.0), or the FC500 flow cytometer systems equipped with the CXP System Software (Version 2.0) or equivalent flow cytometer with four-fluorescence sensors to analyze samples.

PRINCIPLE

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

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

EXAMPLES OF CLINICAL APPLICATIONS

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

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

REAGENT CONTENTS

Stem-Kit Reagents contain the following:

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

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

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

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

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

Summary of antibodies characteristics

Specificity	CD45	CD34
Clone	J33	581
Hybridoma	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Immunogen	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Ig Chain	IgG1, κ light chains	IgG1, κ light chains
Species	Mouse	Mouse
Conjugation	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
Molar ratio	5 – 8 moles FITC / mole Ig	0.5 – 1.5 moles PE / mole Ig
Excitation wavelength	488 nm (blue-green)	488 nm (blue-green)
Fluorescence emission	504 to 541 nm (mainly green)	568 to 590 nm (mainly orange)

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

WARNING AND PRECAUTIONS

1. Monoclonal antibody preparations contain 0.1% sodium azide. Sodium azide, under acidic conditions, yields hydrazoic acid, an extremely toxic compound. Disposal into sewage systems should be accompanied with large quantities of running water to avoid dangerous buildup in metal piping and potential explosions.
2. Specimens, samples and all material coming in contact with them should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.
3. Never pipet by mouth and avoid contact of samples or reagents with skin and mucous membranes.
4. Do not use reagents beyond the expiration dated on the vial label.
5. Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres contain 1% formaldehyde. Avoid contact with skin and eyes as formaldehyde may cause irreversible effects to these tissues. Do not breathe vapors. Wear appropriate safety equipment such as gloves and eye protection.
6. Do not expose Stem-Kit Reagents to strong light or to heat during storage or use.
7. Avoid evaporation and leakage of Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres, or erroneous results may occur. Tightly cap the vials after use and store upright.
8. Ensure the fluorospheres are completely resuspended before use. Avoid excessive mixing to minimize the formation of air bubbles. Do not pipet air bubbles or erroneous results may occur.
9. Use a calibrated pipet (positive displacement or repeater pipets, preferred) for dispensing samples and Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres, or erroneous results may occur.
10. Use pipetting techniques recommended by the pipet manufacturer to ensure accurate and precise pipetting of samples and Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres, or erroneous results may occur.
11. Stained and lysed samples must be analyzed on the flow cytometer within 1 hour of adding Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres, or erroneous results may occur.
12. Ensure that at least 1,000 Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres are counted, or the automatic conversion of results to absolute counts will not occur.
13. Each lot of Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres has a specific concentration of fluorospheres. Ensure the correct assayed concentration is used when determining absolute count results.
14. Preparation methods requiring a wash step should not be used due to an unknown loss of cells.
15. The use of incubation or mixing times, or temperatures other than those specified, may give erroneous results.
16. 7-AAD Viability Dye contains 0.005% 7-AAD. Pure 7-AAD is a potential carcinogen. Although this compound is highly diluted, we recommend to avoid contact with skin and eyes, to wear suitable protective clothing and gloves and appropriate eye / face protection.
17. 7-AAD Viability Dye contains 1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Pure DMSO is an irritant. Although this compound is diluted, we recommend avoiding contact with skin and eyes, to wear suitable protective clothing and gloves, and appropriate eye / face protection.
18. As a chromophore, 7-AAD is sensitive to light. Store the 7-AAD Viability Dye within the kit's cardboard packaging container to avoid continuous exposure to light during storage.
19. Minimize exposure of mixed samples to light during incubation.
20. Use general good laboratory practices when handling reagents.

GHS HAZARD CLASSIFICATION

Stem-Count™ Fluorospheres DANGER





H316
H317
H350
P201
P280

Causes mild skin irritation.
May cause an allergic skin reaction.
May cause cancer.
Obtain special instructions before use.
Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.
If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
Take off contaminated clothing and wash it before use.
Formaldehyde 0.5 - 1.0%
reaction mass of:
5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 247-500-7] and
2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) < 0.05%

P308+P313

P333+P313

P362+P364

7-AAD Viability Dye

WARNING
H316
P332+P313

Causes mild skin irritation.
If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
Dimethyl Sulfoxide 0.5 - 2%

SDS

Safety Data Sheet is available at
techdocs.beckmancoulter.com

EUROPEAN HAZARD CLASSIFICATION

CD45-FITC/CD34-PE

Xn;R22
R22
S28

Harmful if swallowed.
After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

CD45-FITC/IsoClonic™
Control-PE

Xn;R22
R22
S28

Harmful if swallowed.
After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

Stem-Count™ Fluorospheres

Xn;R40-43
R40
R43
S26

Limited evidence of a carcinogenic effect
May cause sensitization by skin contact.
In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

S36/37/39

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

S51

Use only in well ventilated areas.

STORAGE CONDITIONS AND STABILITY

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

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

Evidence of Deterioration

Evidence of deterioration may occur in the following situations:

Stem-Kit Reagents, except Stem-Count Fluorospheres

- A change in normal appearance as listed below

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

Stem-Count Fluorospheres

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

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

Reagent Preparation

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

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

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

Avoid evaporation and leakage by tightly capping vial after use.

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

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

SPECIMEN HANDLING

Specimen Requirements

1. Biological specimens include fresh, normal or mobilized peripheral whole blood, and fresh or thawed apheresis products, cord blood and bone marrow.
2. Manipulated or purified hematopoietic progenitor cells (HPC) can only be analyzed with the manual gating method.
3. Collect apheresis products, peripheral blood samples, cord blood specimens or bone marrow samples aseptically into a sterile evacuated blood collection tube with anticoagulant (ACD formula A, K3EDTA). Anticoagulated specimens should be stored at room temperature (18 – 25°C) until staining (within 24 hours).
4. Prior to sample preparation, ensure that the white blood cell (WBC) concentration is no greater than 30 x 10⁹ WBC cells / L. If necessary, dilute the sample with HBSS or equivalent to reach an average value of 15 x 10⁹ WBC cells / L. Record the dilution factor for the calculation of the final HPC absolute count.
5. Low protein concentrations may lead to Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres clumping and give erroneously high absolute cell counts. Dilution of specimens with a low protein concentration must be performed using a protein-enriched buffer.
6. All specimens should be processed with Stem-Kit Reagents including the 7-AAD Viability Dye.

Procedure for Specimen Processing

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

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

1. For each specimen sample, label three tubes as follows:
 - 45/34/7-AAD #1

- 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Pipet 20 µL of CD45-FITC / CD34-PE Reagent into tubes: 45/34/7-AAD #1 and 45/34/7-AAD #2.
 3. Pipet 20 µL of CD45-FITC / IsoClonic Control-PE Reagent into the tube: 45/CTRL/7-AAD.
 4. Pipet 20 µL of 7-AAD Viability Dye into all tubes.

IMPORTANT: Risk of incomplete lysis if blood specimen remains on the top or side of the test tube. Use care when pipetting to prevent the blood from touching the top or side of the test tube. Clean the tube with a cotton swab, if necessary, to remove all traces of blood specimen from the top or side of the test tube.

5. Using a positive displacement pipet or repeater pipet, pipet 100 µL of the patient sample into the tube.
6. Immediately vortex the tube for 5 seconds.
7. Incubate all tubes at room temperature (18 – 25°C) for 20 minutes, protected from light.
8. After incubation, add 2 mL of prepared 1X NH₄Cl Lysing Solution to each tube and vortex immediately for 5 seconds.

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

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

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

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

Specimen Staining Summary

Reagents / Samples	45/34/7-AAD #1	Test Tube Label 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
7-AAD Viability Dye	20 µL	20 µL	20 µL
Specimen	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex – Incubate at room temperature for 20 minutes. Protect from light.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 mL	2 mL	2 mL
Vortex – Incubate at room temperature for 10 minutes. Protect from light.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Vortex – Wait for no more than 1 hour on melting ice prior to acquisition. Analyze the thawed samples immediately. Protect from light.			

CONTENTS

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

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

MATERIALS NEEDED BUT NOT SUPPLIED WITH KIT:

1. Deionized water.
2. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) or equivalent
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Stem-Comp Reagent (Ref. IM3631)
5. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)

6. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
7. CYTO-COMP™ Cell Kit (Ref. 6607023)
8. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
9. As an alternative to Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (Ref. 7547053)
10. Ice water bath
11. Plastic test tubes (12 x 75 mm)
12. Calibrated repeater pipet (20 µL, 100 µL, 2 mL) and tips or calibrated positive displacement pipets (20 µL, 100 µL, 2 mL) and tips
13. Calibrated standard pipette (20 µL, 100 µL, 2 mL) and tips.
14. Vortex mixer.
15. Timer.
16. Flow cytometer.
17. stemONE System Software (Ref. 6915452), ONLY for automated analysis of samples on COULTER EPICS XL/ XL-MCL flow cytometers equipped with System II Software (Version 3.0)
18. stemCXP System Software (Ref. 628843), ONLY for automated analysis of samples on FC500 flow cytometer system equipped with CXP Software (Version 2.0).

RESULTS

Analysis Protocol Setup

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

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

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

NOTE: In the following analytical strategy description, instructions for COULTER EPICS XL / XLMCL brand flow cytometers are specified and can be adapted accordingly on FC500 flow cytometer system or equivalent.

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

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

Histogram Creation

Create histograms as follows:

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

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

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

Region Creation

Create regions as follows:

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

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

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

Gate Creation

Create gates as follows:

1. Histogram 1 – Assign “J” to Histogram 1 to display all viable events. If 7-AAD is not used assign “-H” region to Histogram 1 to display all events excluding all Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres including doublets.
2. Histogram 2 – Assign “AJ” (“A” if 7-AAD is not used) to Histogram 2 to display viable (total if 7-AAD is not used) CD34+ events.
3. Histogram 3 – Assign “A” and “B” and “J” (“A” and “B” if 7-AAD is not used) to Histogram 3 to display all viable (total if 7-AAD is not used) CD45+ / CD34+ events.
4. Histogram 4 – Assign “A” and “B” and “C” and “J” (“A” and “B” and “C” if 7-AAD is not used) to Histogram 4 to display viable (total if 7-AAD is not used) CD45+ / CD34+ clustered events with low side scatter while excluding platelets and debris. Events from Region ABCDJ are real viable CD34+HPC.
5. Histogram 5 – Ungated to display all events.
6. Histogram 6 – Assign “EJ” (“E” if 7-AAD is not used) to Histogram 6 to display viable (total if 7-AAD is not used) lymphocytes as a visual check on the discriminator.
7. Histogram 7 – Assign “H” to Histogram 7 to display all Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres including doublets.
8. Histogram 8 – Assign “A” to Histogram 8 to display CD45+ events.

Flow Cytometry Setting

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

Analysis Example

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

Calculation of CD34+ HPC for Specimen

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

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

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

NOTES:

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

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

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

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

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

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

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

Where:

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

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

QUALITY CONTROL

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

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

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

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

PERFORMANCE

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

Expected Values for Reference Ranges

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

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

Normal Whole Blood: Reference Ranges

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

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

Linearity

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

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

CD34+ Spiked Whole Blood Results

See Appendix for graph.

Peripheral (Mobilized) Blood Results

See Appendix for graph.

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

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

Accuracy of Method - CD34+ (%)

See Appendix for graph.

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

See Appendix for graph.

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

See Appendix for graph.

Accuracy of Method (Automated vs. Manual Results)

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

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

Accuracy of Methods (Figures)

Fresh Peripheral Whole Blood Specimens (n = 59)

See Appendix for graph.

Fresh Apheresis Specimens (n = 51)

See Appendix for graph.

Fresh Cord Blood Specimens (n = 29)

See Appendix for graph.

Fresh Bone Marrow Specimens (n = 33)

See Appendix for graph.

Thawed Apheresis Specimens (n = 23)

See Appendix for graph.

Thawed Cord Blood Specimens (n = 31)

See Appendix for graph.

Thawed Bone Marrow Specimens (n = 20)

See Appendix for graph.

Precision

Interlaboratory Precision

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

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

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

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

See Appendix for graph.

Intralaboratory Precision

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

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

See Appendix for graph.

LIMITATIONS

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

- Stained and lysed samples must be stored on ice and analyzed on the flow cytometer within 1 hour of adding Stem-Count Fluorospheres or Flow-Count Fluorospheres or erroneous results can occur.
- Do not dilute, aliquot, or freeze the reagents. Use only as packaged.

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

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, COULTER, COULTER COUNTER, CXP, CYTO-COMP, EPICS, Flow-Check, Flow-Count, Flow-Set, IsoClonic, QuickCOMP, Stem-Comp, Stem-Count, stemCXP, Stem-Kit, stemONE, Stem-Trol, System II, XL and XL-MCL are trademarks of Beckman Coulter, Inc., and registered with the USPTO.

Реагенты Stem-Kit™

REF IM3630 50 тестов

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

В набор реагентов Stem-Kit™ входят реагент с мышиним моноклональным антителом, меченным двухцветным флуоресцентным красителем (FITC, PE), контрольный мышиный изоклон, меченый двухцветным флуоресцентным красителем (FITC, PE), реагент абсолютного количества, реагент жизнеспособности и реагент для лизирования. Набор предназначен «Для *in vitro* диагностики» для одновременной идентификации и подсчета процентного содержания и абсолютных количеств популяций клеток CD45+ и двойственно-положительных клеток CD45+ CD34+ в биологических образцах методом проточной цитометрии. В число биологических образцов входят образцы свежей нормальной или мобилизованной периферийной цельной крови, и образцы свежих либо оттаянных продуктов афереза, пуповинной крови или костного мозга. Измерения популяций клеток можно производить либо автоматизированным методом сортировки и анализа, либо вручную.

См. вкладыш к набору реагентов Stem-Kit, чтобы получить полные инструкции по ручному анализу. См. stemONETM System Guide (Руководство по системе stemONETM) или stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP) с программным обеспечением системы stemONE (REF 6915452) или с программным обеспечением системы stemCXP (REF 628843) соответственно, чтобы получить полные инструкции относительно использования автоматического метода.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Гемопоэтические клетки-предшественники (HPC)

Реагенты Stem-Kit разработаны для идентификации человеческих гемопоэтических клеток-предшественников (HPC), причем для этой процедуры установлены следующие критерии: «истинные клетки CD34+ (a) экспрессируют антиген CD34, (b) экспрессируют антиген CD45 с характеристиками окраски, соответствующими бластным клеткам (то есть клетки легко распознаются, но на более низких уровнях, чем лимфоциты и моноциты), и (c) выявляют характеристики рассеяния бластных клеток с малым боковым углом и с передним углом, значение которого находится в диапазоне от малого до среднего» (1). Краситель 7-AAD, разработанный для выявления жизнеспособности, позволяет исключать мертвые CD34+ HPC из числа подсчитанных CD34+ HPC (2).

CD34

Антиген CD34 представляет собой семейство дифференциально гликозилированных трансмембранных одноцепочечных гликопротеинов I типа. (3, 4, 5). Он экспрессируется практически всеми гемопоэтическими клетками-предшественниками, включая мультипотентные стволовые клетки. Эпитопы CD34 разделены на три класса в зависимости от чувствительности к нейраминидазе и к гликопротеазе *Pasteurella haemolytica* (6). Моноклональному антителу (mAb) CD34, вошедшему в комплект реагентов Stem-Kit, присвоено обозначение 581. Он специфическим образом распознает эпитопы III класса молекул CD34 (7), что определяется схемой ферментативного расщепления (6, 8). Моноклональное антитело 581 было признано специфичным в отношении антигена CD34 во время 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), проходившем в 1993 г. в Boston, Massachusetts, USA (США) (7).

CD45

Антитело CD45 распознает членов семейства CD45 пан-клеточных лейкоцитарных антигенов, молекулярный вес которых составляет 180, 190, 210 и 220 кДа (9, 10, 11). Он также известен, как общий лейкоцитарный антиген (LCA). Антиген CD45 экспрессируется на гемопоэтических клетках любого типа за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников (11, 12). В дифференцированных негемопоэтических тканях (12, 13, 14, 15) он обнаружен не был. Моноклональное антитело CD45 mAb, входящее в комплект реагентов Stem-Kit, носит обозначение J33. Оно было присвоено антигену CD45 во время 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека) в Oxford, Англия, в 1986 году (16).

7-AAD

Краситель для определения жизнеспособности 7-амино-актиномицин D (7-AAD) является аналогом актиномицина D, содержащим замещенную аминогруппу в 7-й позиции хромофора. Краситель для определения жизнеспособности 7-AAD интеркалирует между цитозиновым и гуаниновым основаниями ДНК (15). Актиномицины являются биологически активными соединениями, содержащими хромофор 2-амино-4, 6 диметилфеноксазона-3 и два циклических пентапептида (17). Актиномицины образуют стабильные комплексы с двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), но ни с двухцепочечной рибонуклеиновой кислотой (РНК), ни с гибридами РНК-ДНК, ни с одноцепочечными РНК и ДНК они этих комплексов не образуют (15, 18).

Спектральные свойства красителя 7-AAD, разработанного для выявления жизнеспособности, делают эту молекулу особенно подходящей для анализа средствами проточной цитометрии (17). Максимальное значение абсорбции комплекса 7-AAD / ДНК достигается в зеленом регионе спектра, и таким образом, оно оказывается подходящим для цитометров, снабженным аргоновым лазером (длина волны возбуждения составляет 488 нм) (15). Ввиду

испускания красителем 7-AAD, предназначенным для определения жизнеспособности (от 635 до 675 нм), темно-красной флуоресценции, использовать эту пробу будет проще в сочетании с антителами, конъюгированными с флуоресцинизоцианатом (FITC) и с фикоэритрином (PE), потому что в отличие от пропидиума иодида (PI), комплекс 7-AAD / ДНК дает минимальное спектральное перекрытие с FITC и PE (17).

При анализе жизнеспособных клеток с помощью проточной цитометрии апоптотические, некротические клетки, а также поврежденные клетки являются источником интерференции. Нежизнеспособные клетки следует оценивать и выделять, прибегая к 7-AAD-позитивному окрашиванию, когда жизнеспособные клетки остаются неокрашенными (отрицательный признак) (19).

Системы проточных цитометров

В системах проточной цитометрии (XL, FC500 и аналогичных) принципы проточной цитометрии применяются при анализе биологических образцов с тем, чтобы на основе используемых в ходе теста специфических моноклональных антител, поведение которых анализируется с помощью флуорохромов, идентифицировать различные клеточные популяции. Для анализа проб в ходе настоящего теста используются системы проточной цитометрии COULTER®EPICS® XL™/XL-MCL™, снабженные программным обеспечением System II™ (версия 3.0), системы проточной цитометрии FC500, снабженные программным обеспечением системы CXP (версия 2.0) или аналогичные проточные цитометры с флуоресцентными красителями четырех цветов.

ПРИНЦИП

Настоящий тест зависит от способности моноклональных антител связывать поверхность клеток, экспрессирующих дискретные антигенные детерминанты. Реагент CD45-FITC / CD34-PE из набора реагентов Stem-Kit является комбинацией двух мышиных моноклональных антител; каждое из них конъюгировано со специфическим флуорохромом и является специфичным для своего антигена на клеточной поверхности. К специфическому окрашиванию клеточной поверхности добавляется инкубация дублирующей пробы биологического образца с помощью двухцветного реагента CD45-FITC / CD34-PE.

В порядке дополнительного теста та же проба окрашивается реагентом CD45-FITC / IsoClonic™ Control-PE для определения реакции неспецифического связывания с моноклональными антителами к антигену CD34-PE. Краситель жизнеспособности 7-AAD, который является красителем нуклеиновой кислоты и связывает доступные пары оснований (клеточные ДНК), используется для того, чтобы отличать жизнеспособные клетки от нежизнеспособных. Эритроциты в каждой пробе подвергаются лизису с помощью лизирующего раствора NH₄Cl Lysing Solution, приготовленного в концентрации 1X. Добавляются флуоросферы Stem-Count™ или Flow-Count™ (реагенты для определения абсолютного количества), а оставшиеся клетки анализируются в проточном цитометре. Контроль процесса и контроль качества в ходе проведения испытания обеспечивается специальными реагентами для контроля за инструментом и для контроля за качеством проб: флуоросферами Flow-Check™, флуоросферами Flow-Set™, реагентами Stem-Comp™ или подходящими компенсационными реагентами, а также контрольными клетками Stem-Trol™.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Как показывает история, первые научные исследования, посвященные гемопоэтическим клеткам-предшественникам (НРС), основывались на подсчете ядродержащих клеток с целью количественного определения. Последующие исследования, включавшие в себя анализ колониеобразующих единиц (КОЕ), давали грубое приближение популяций клеток-предшественников. На смену анализу КОЕ, сопряженному с большими временными затратами, пришло открытие молекул поверхности клеток CD34. Как выяснилось, CD34 присутствует на поверхности ранних гемопоэтических клеток, а также на поверхности колониеобразующих клеток в костном мозге и в периферической крови (20). Затем были выведены моноклональные антитела, направленные против молекул CD34; они нашли себе применение в проточной цитометрии. Определение CD34 средствами проточной цитометрии в настоящее время получило широкое признание в качестве метода количественного анализа гемопоэтических клеток-предшественников и стволовых клеток.

У обычного индивида от 1 до 3% клеток костного мозга, экспрессирующих антиген CD34, в состоянии восстановить долгосрочный мультилинейный гемопоэз (3, 20). В периферической крови обычного индивида антиген CD34 выделяется менее чем 0,1% циркулирующих клеток (1, 21). Использование реагентов Stem-Kit обеспечивает простой, быстрый и высокочувствительный метод цитометрии для подсчета гемопоэтических клеток-предшественников и стволовых клеток в периферической крови, продуктах лейкофереза, костном мозге и пуповинной крови.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Реагенты Stem-Kit содержат следующее:

- Реагент CD45-FITC / CD34-PE (45/34) — 1 флакон.
 - Реагент CD45-FITC / IsoClonic Control-PE (45/CTRL) — 1 флакон.
 - Флуоросферы Stem-Count — 1 флакон.
 - Краситель жизнеспособности 7-AAD — 1 флакон.
 - Лизирующий раствор 10X NH₄Cl Lysing Solution — 2 флакона.
1. Эти реагенты следует использовать как единый комплект, именно так, как они выпускаются.

При использовании специфических концентраций, установленных в целях исследования, для определения абсолютных количеств можно применять флуоросферы Flow-Count, эквивалентные флуоросферам Stem-Count.

2. CD45-FITC / CD34-PE — это готовый к употреблению двухцветный реагент, поставляемый в натрий-фосфатном буферном растворе (PBS) объемом 2,2 мл с альбумином бычьей сыворотки (BSA) содержанием 2 мг/мл и 0,1%-ным азидом натрия в качестве консерванта.
3. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE — это готовый к употреблению двухцветный реагент, поставляемый в натрий-фосфатном буферном растворе объемом 1,2 мл с альбумином бычьей сыворотки содержанием 2 мг/мл и 0,1%-ным азидом натрия в качестве консерванта. Реагент CD45-FITC / IsoClonic Control-PE представляет собой смесь неконъюгированных и конъюгированных фикоэритрином (идентичных CD34) моноклональных антител 581. Это смесь является подходящим средством изоморфологического контроля, позволяющим проверить наличие неспецифического связывания CD34-PE mAb в каждой пробе.

ЗАМЕЧАНИЕ: Реагенты CD45-FITC / CD34-PE и CD45-FITC / IsoClonic Control-PE разделять нельзя. При проведении тестов и контрольных измерений необходимо следить за тем, чтобы у обоих реагентов на этикетке флакона был один и тот же номер серии.

Сводка характеристик антител

Специфичность	CD45	CD34
Клон	J33	581
Гибридома	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Иммуноген	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Иммуноглобулин	Иммуноглобулин IgG1, легкие цепи к	Иммуноглобулин IgG1, легкие цепи к
Вид	Мышь	Мышь
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	R Фикоэритрин (PE)
концентрация	5–8 молей FITC (флуоресцинизоотиоцианата) на моль иммуноглобулина	0,5–1,5 моля PE (фикоэритрина) на моль Ig (иммуноглобулина)
λ возбуждения	488 нм (сине-зеленый)	488 нм (сине-зеленый)
Испускание флуоресценции	От 504 до 541 нм (преимущественно зеленый цвет)	От 568 до 590 нм (преимущественно оранжевый цвет)

4. Флуоросферы Stem-Count и Flow-Count состоят из полистирольных флуоресцирующих микросфер диаметром 10 мкм (номинальный диаметр), погруженных в 20 мл водной суспензионной среды, содержащей сурфактант и 1% формальдегида. Каждая калибровочная частица содержит краситель с диапазоном флуоресценции от 525 нм до 700 нм при возбуждении волной на 488 нм. Оцениваемая концентрация флуоросфер Stem-Count или флуоросфер Flow-Count (число флуоросфер в 1 мкл) выводится по результатам многократных параллельных испытаний в анализаторе размеров частиц COULTER. Значение для каждой серии указано на этикетке флакона.
5. Краситель жизнеспособности 7-AAD выпускается в 99-процентном натрий-фосфатном буферном растворе (PBS: 0,01 М фосфат натрия, 0,145 М хлорид натрия, pH 7,2) с добавлением 1%-ного диметилсульфоксида (DMSO).
6. Лизирующий раствор NH₄Cl Lysing Solution выпускается во флаконах вместимостью 20 мл в десятикратной концентрации. Он содержит смесь хлорида аммония (NH₄Cl), бикарбоната калия (KHCO₂) и динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Препараты моноклональных антител содержат 0,1%-ный раствор азиды натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. При сливании отходов в канализационную сеть следует открыть кран с водопроводной водой и дать протечь большому количеству воды во избежание взрывоопасных скоплений на трубах.
2. При работе с образцами и пробами, а также любыми контактирующими с ними материалами, следует выполнять правила и соблюдать меры предосторожности, установленные для потенциально инфицированных материалов.
3. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания проб или реагентов на кожу и слизистые оболочки.
4. Не используйте реагенты по истечении срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. Флуоросферы Stem-Count и Flow-Count содержат 1% формальдегида. Избегайте попадания формальдегида на кожу и в глаза, так как он может стать причиной необратимых повреждений этих тканей. Не вдыхайте пары. Используйте подходящие средства защиты, такие как перчатки и защита глаз.
6. Реагенты Stem-Kit нельзя подвергать воздействию яркого света или высоких температур ни во время хранения, ни при использовании.

7. Чтобы избежать получения ошибочных результатов измерения, не допускайте испарения и утечки флуоросфер Stem-Count и Flow-Count. После использования плотно закрывайте флаконы колпачками и храните их в вертикальном положении.
8. Перед использованием убедитесь, что калибровочные частицы полностью возвращены в состояние суспензии. Избегайте избыточного перемешивания, чтобы свести к минимуму образование пузырьков воздуха. Во избежание получения ошибочных результатов не пипетируйте пузырьки воздуха.
9. Для дозирования проб, флуоросфер Stem-Count или Flow-Count используйте калиброванные пипетки (предпочтение следует отдавать пипеткам прямого вытеснения или капиллярам), это позволит избежать получения ошибочных результатов.
10. Во избежание получения ошибочных результатов и с целью правильного и точного отбора проб и флуоросфер Stem-Trol или флуоросфер Flow-Count, используйте техники пипетирования, рекомендованные производителем пипетки.
11. Во избежание получения ошибочных результатов окрашенные и лизированные пробы следует исследовать в проточном цитометре не позже чем через 1 час после добавления флуоросфер Stem-Count или Flow-Count.
12. Убедитесь в том, что произведен подсчет по крайней мере 1 000 флуоросфер Stem-Count или флуоросфер Flow-Count, в противном случае автоматической конверсии результатов в подсчет абсолютного количества не произойдет.
13. Для каждой партии флуоросфер Stem-Count или Flow-Count характерна специфическая концентрация флуоросфер. Убедитесь, что используется правильная аналитическая концентрация при определении результатов определения абсолютного количества клеток-мишеней.
14. Не следует использовать методы подготовки, требующие шага промывки, в связи с неизвестной потерей клеток.
15. Если время инкубации или смешивания или соответствующие температуры будут разниться с теми, которые указаны в инструкции, результаты могут оказаться неправильными.
16. Краситель жизнеспособности 7-AAD содержит 0,005% 7-AAD. Вещество 7-AAD в неразбавленном виде является потенциальным канцерогеном. Хотя это соединение и используется в сильно разведенном виде, мы рекомендуем избегать контакта с кожей и с глазами, использовать защитную одежду и перчатки и соответствующие средства защиты глаз и лица.
17. Краситель жизнеспособности 7-AAD содержит 1% диметилсульфоксида (DMSO). В чистом виде DMSO вызывает раздражение. Хотя это соединение и используется в разведенном виде, мы рекомендуем избегать контакта с кожей и с глазами, использовать защитную одежду и перчатки и соответствующие средства защиты глаз и лица.
18. Будучи хромофором, 7-AAD чувствителен к свету. Хранить краситель жизнеспособности 7-AAD нужно в картонной упаковке набора, что позволит избежать длительного воздействия света во время хранения.
19. Во время инкубации сведите к минимуму воздействие света на смешанные пробы.
20. При обращении с реагентами соблюдайте общие правила работы в лаборатории.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ GHS

Флуоросферы Stem-Count™

ОПАСНО



H316

Вызывает легкое раздражение кожи.

H317

Может вызывать аллергическую кожную реакцию.

H350

Может вызвать рак.

P201

Перед использованием получить специальные инструкции.

P280

Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения/лица.

P308+P313

ПРИ оказании воздействия или беспокойства: обратиться к врачу.

Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	P333+P313	При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
	P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
		Формальдегид 0,5 - 1,0% реакционная масса из 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин -3-она [ЕС № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин -3-она [ЕС № 220-239-6](3:1) < 0,05%
	ОСТОРОЖНО	
	H316	Вызывает легкое раздражение кожи.
	P332+P313	При раздражении кожи: обратиться к врачу. Диметил сульфоксид 0,5 - 2%

SDS

Паспорт безопасности доступен на сайте
techdocs.beckmancoulter.com.

ЕВРОПЕЙСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ

CD45-FITC/CD34-PE	Xn;R22	Оказывает вредное воздействие при проглатывании. При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды.
	R22	
CD45, меченные FITC/IsoClonic™, контроль PE	S28	Оказывает вредное воздействие при проглатывании. При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды.
	Xn;R22	
Флуоросферы Stem-Count™	R22	Имеются ограниченные данные о канцерогенном воздействии Может стать причиной повышенной чувствительности при контакте с кожей.
	S28	
	Xn;R40-43	При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью. Носить соответствующую защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз/лица.
	R40	
	R43	
	S26	
	S36/37/39	
	S51	Использовать только в хорошо проветриваемых помещениях.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент сохраняет свои свойства вплоть до истечения срока годности, указанного на флаконе, если его хранить при температуре 2–8°C в темном месте. Не используйте после истечения срока годности. Не замораживайте. Реагенты Stem-Kit сохраняют свои свойства в течение 30 дней после вскрытия флаконов с флуоросферами Stem-Count или Flow-Count. Вскрытые флаконы следует закрыть колпачком сразу же после использования и поместить на хранение в темное место с температурой 2–8°C. Флуоросферы Stem-Count или Flow-Count НЕЛЬЗЯ аликвотировать в посторонние флаконы; они должны храниться только в своих оригинальных флаконах.

ВАЖНО: В случае утечки флуоросфер Stem-Count или Flow-Count возникает риск получения ошибочных результатов. После вскрытия флуоросферы Stem-Count или Flow-Count необходимо хранить в вертикальном положении во избежание возможности утечек. Не следует использовать реагенты, если наблюдаются признаки утечки.

Признаки непригодности

К числу признаков порчи может быть отнесено следующее:

Реагенты Stem-Kit, за исключением флуоросфер Stem-Count

- Внешние изменения, см. ниже описание нормального внешнего вида для каждого вещества

Реагент	Нормальный внешний вид
CD45-FITC / CD34-PE	Прозрачная, слегка розовая жидкость
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Прозрачная или розоватая жидкость
Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	Прозрачная жидкость, от розоватого до красноватого цвета
Лизирующий раствор NH ₄ Cl Lysing Solution	Прозрачная бесцветная жидкость

Stem-Count Fluorospheres

- Обнаруживаемые во время сбора данных признаки наличия второй флуоресцирующей популяции, которая составляет более 20% от общей популяции флуоросфер.
- При подсчете количеств и проб наблюдаются большие вариации значений.

ВАЖНО: В случае появления признаков порчи реагентами пользоваться нельзя, поскольку возможны ошибки в результатах. При обнаружении признаков порчи обратитесь в местное представительство компании Beckman Coulter.

Подготовка реагентов

- Двухцветные реагенты CD45-FITC / CD34-PE и CD45-FITC / IsoClonic Control-PE следует использовать непосредственно из флакона в неразведенном виде.
- Флуоросферы Stem-Count и Flow-Count используются непосредственно из флаконов, без разведения. При первом вскрытии с верха флакона следует удалить весь алюминий термосвариваемого покрытия. Субстанции необходимо как следует перемешать. Впервые приступая к работе с флуоросферами Stem-Count или Flow-Count в начале дня, перемешайте их на вортексе в течение 3–5 секунд.

Перед пипетированием из флакона осторожно встряхните жидкость, перевернув флакон 3–5 раз.

После перемешивания на вортексе в начале дня восстановите значения температуры флакона, соответствующие 2–8°C; эта температура должна поддерживаться в течение всего времени, пока продукт не будет использован.

Во избежание испарения и утечек плотно закрывайте флакон колпачком после использования.

- Краситель 7-AAD, разработанный для определения жизнеспособности, используется прямо из флакона без разведения.
- Лизирующий раствор 1X NH₄Cl Lysing Solution необходимо готовить ежедневно: добавьте девять частей деионизированной воды к одной части лизирующего раствора NH₄Cl Lysing Solution, имеющего 10-кратную концентрацию. Не охлаждайте в холодильнике. В конце дня неиспользованный лизирующий раствор 1X NH₄Cl Lysing Solution утилизируют.

Прежде чем использовать какой-либо реагент, разогрейте его до комнатной температуры (18–25°C).

ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Требования к образцам

- В число биологических образцов входят образцы свежей нормальной или мобилизованной периферийной цельной крови, и образцы свежих либо оттаянных продуктов афереза, пуповинной крови или костного мозга.
- Гемопозитические клетки-предшественники (HPC), подвергнутые манипуляциям или очищению, можно анализировать только в режиме ручной сортировки.
- Для сбора продуктов афереза, проб периферической крови, образцов пуповинной крови или проб костного мозга используйте стерильную вакуумную пробирку с антикоагулянтом для сбора крови (ACD формула A, K3EDTA); эта мера обеспечит асептический режим. Перед процедурой окрашивания (которая должна быть произведена не позднее чем через 24 ч) антикоагулированные образцы следует хранить при комнатной температуре (18–25°C).
- Прежде чем подготавливать пробу, убедитесь в том, что концентрация лейкоцитов (WBC) не превышает 30 x 10⁹ лейкоцитов на литр. В случае необходимости разведите пробу с помощью HBSS (сбалансированный солевой раствор Хенкса) или аналогичного средства, для того, чтобы достичь концентрации 15 x 10⁹ WBC на литр. Запишите коэффициент разведения для окончательного расчета абсолютного количества HPC.

5. Низкие концентрации белка могут приводить к комкованию флуоросфер Stem-Count или флуоросфер Flow-Count, результатом чего могут оказаться искусственно завышенные абсолютные количества клеток. Образцы с низким содержанием белка следует разводить буферным раствором, содержащим белок.
6. Все образцы следует обрабатывать реагентами Stem-Kit, включая краситель жизнеспособности 7-AAD.

Процедура пробоподготовки

Выполните испытания дважды, следуя инструкциям «The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry» (Директивы ISHAGE по определению клеток CD34+ с помощью проточной цитометрии) (1).

ЗАМЕЧАНИЕ: Для работы с контрольными клетками Stem-Trol в том случае, если выбран метод вручную, воспользуйтесь исчерпывающими инструкциями, приведенными на вкладыше в упаковке к набору контрольных клеток Stem-Trol. Если вы используете автоматический метод, ознакомьтесь со stemONE System Guide (Руководство по системе stemONE) с программным обеспечением системы stemONE или stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP) с программным обеспечением системы stemCXP, в которых приведены исчерпывающие инструкции.

1. Для каждой пробы образца нанесите на пробирки следующие обозначения:
 - 45/34/7-AAD #1
 - 45/34/7-AAD #2
 - 45/CTRL/7-AAD
2. Пипетируйте 20 мкл реагента CD45-FITC / CD34-PE в пробирки: 45/34/7-AAD #1 и 45/34/7-AAD #2.
3. Пипетируйте 20 мкл реагента CD45-FITC / IsoClonic Control-PE в пробирку: 45/CTRL/7-AAD.
4. С помощью пипетки добавьте во все пробирки по 20 мкл красителя жизнеспособности 7-AAD.

ВАЖНО: Риск неполного лизиса, если образец крови остается в верхней части или на боковой стороне тестовой пробирки. Выполняйте пипетирование с осторожностью, чтобы избежать попадания крови на верхнюю или боковую часть тестовой пробирки. Очистите пробирку ватным шариком, если требуется, чтобы удалить все следы образца крови с верхней или боковой части тестовой пробирки.

5. Используя пипетку прямого вытеснения или репипетку, пипетируйте 100 мкл пробы пациента в пробирку.
6. ж) Немедленно перемешивают пробирку на вортексе в течение 5 с.
7. Все пробирки инкубируйте при комнатной температуре (18–25°C) в течение 20 минут, в защищенном от света месте.
8. После инкубации добавьте 2 мл приготовленного лизирующего раствора 1X NH4Cl Lysing Solution в каждую пробирку и незамедлительно обработайте на вортексе в течение 5 секунд.

ЗАМЕЧАНИЕ: Подробные сведения по приготовлению лизирующего раствора Lysing Solution приведены выше в разделе 7.2 «ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ».

ВАЖНО: Риск ошибочных результатов в случае пипетирования пузырьков воздуха. Излишнее перемешивание флуоросфер Stem-Count или Flow-Count может привести к созданию пузырьков воздуха. Не допускайте чрезмерного перемешивания флуоросфер Stem-Count или Flow-Count и не пипетируйте пузырьки воздуха в пробирки с пробой.

9. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 мин, в защищенном от света месте.
10. Осторожно перемешайте флуоросферы Stem-Count или Flow-Count, переворачивая флакон 3–5 раз перед использованием.
11. Перед сбором данных, используя пипетку прямого вытеснения или репипетку, пипетируйте по 100 мкл флуоросфер Stem-Count или Flow-Count в каждую из трех пробирок.
12. Перемешайте на вортексе каждую пробирку в течение 5 секунд.

ЗАМЕЧАНИЕ: Подробные сведения по приготовлению лизирующего раствора Lysing Solution приведены выше в разделе 7.2 «ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ».

Краткая инструкция по окрашиванию образцов

Реагенты и пробы	45/34/7-AAD #1	Наименование тестовой пробирки 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 µL	20 µL	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 µL
Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	20 µL	20 µL	20 µL
Исследуемый материал	100 µL	100 µL	100 µL
Обработайте на вортексе — инкубируйте при комнатной температуре в течение 20 минут. Хранить в темном месте.			
1X NH ₄ Cl Lysing Solution	2 мл	2 мл	2 мл
Обработайте на вортексе — инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 минут. Хранить в темном месте.			
Stem-Count Fluorospheres	100 µL	100 µL	100 µL
Перемешать на вортексе — хранить на тающем льду перед сбором данных не более 1 часа. Оттаянные пробы следует немедленно анализировать. Хранить в темном месте.			

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азиды натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлических трубах водопровода. См. NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76) (Бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH)) «Взрывоопасные азиды (8/16/76)».

Чтобы избежать накопления азидных соединений, промывайте сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азиды натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

1. Деионизированная вода.
2. Сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS) или его эквивалент
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Stem-Comp Reagent (Ref. IM3631)
5. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)
6. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
7. CYTO-COMP™ Cell Kit (Ref. 6607023)
8. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
9. Альтернатива Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF. 7547053)
10. Ледяная ванна
11. Пластиковые тестовые пробирки (12 x 75 мм)
12. Калиброванная репипетер-пипетка (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками или калиброванная пипетка прямого вытеснения (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками
13. Калиброванные стандартные пипетки (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками.
14. Мешалка типа Вортекс (вихревой смеситель).
15. Таймер.
16. Проточный цитометр.
17. Программное обеспечение системы stemONE (REF 6915452) ТОЛЬКО для автоматического анализа проб в проточных цитометрах COULTER EPICS XL/ XL-MCL с программным обеспечением System II (версия 3.0)
18. Программное обеспечение системы stemCXP (REF 628843) ТОЛЬКО для автоматического анализа проб на проточном цитометре FC500 с программным обеспечением CXP (версия 2.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Настройки протокола анализа

Проточный цитометр должен быть оборудован средствами детекции прямого светорассеяния, бокового светорассеяния и четырех каналов флуоресценции. Для канала FL3 (для мониторинга флуоросфер Stem-Count или Flow-Count) используйте полосовой фильтр диапазонов 620 нм. Для канала FL4 (для мониторинга красителя жизнеспособности 7-AAD) используйте длинноволновой фильтр 675 нм.

Убедитесь в том, что проточный цитометр корректно отрегулирован, а измерение интенсивности флуоресценции стандартизировано.

9.2.3 Убедитесь в корректности настроек компенсации флуоресценции.

ЗАМЕЧАНИЕ: В следующем описании аналитической стратегии приводятся инструкции для проточных цитометров марки COULTER EPICS XL / XLMCL, которые можно адаптировать для проточного цитометра FC500 или эквивалентного проточного цитометра.

При анализе образцов все положения областей до момента завершения сбора материала пробирки 45/34/7-AAD #1 определяются приблизительно. Области оптимизируются согласно следующему протоколу и затем, при работе со второй и третьей пробиркой серии, никаких корректировок не допускается.

Для анализа образца необходимо следовать серии из 8 гистограмм и схеме сортировки (см. ниже). Этой же серии из 8 гистограмм и этой же схеме сортировки нужно следовать при использовании контрольных клеток CD34+. Области A, B, C и D (определения областей см. под заголовком «Создание области») должны быть откорректированы так, чтобы они включали кластер характеристик контрольных клеток CD34+.

Построение гистограмм

Создайте гистограммы следующим образом:

1. Создайте гистограмму 1 как FL1 CD45-FITC относительно бокового рассеяния.
2. Создайте гистограмму 2 как FL2 CD34-PE относительно бокового рассеяния.
3. Создайте гистограмму 3 как FL1 CD45-FITC относительно бокового рассеяния.
4. Создайте гистограмму 4 как прямое рассеяние относительно бокового рассеяния.
5. Создайте гистограмму 5 как FL1 CD45-FITC относительно FL2 CD34-PE.
6. Создайте гистограмму 6 как прямое рассеяние относительно бокового рассеяния.
7. Создайте гистограмму 7 как время относительно флуоросфер FL3 Stem-Count или Flow-Count.
8. Создайте гистограмму 8 как краситель жизнеспособности FL4 7-AAD относительно бокового рассеяния.

Гистограммы 1–4 предназначены для описания CD34+ HPC, этот процесс можно отложить до этапа анализа. Эти первые четыре гистограммы настраиваются согласно ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (Руководство ISHAGE по определению клеток CD34+ методом проточной цитометрии) (1,2). Гистограммы 5–7 предназначены для мониторинга параметров, которые имеют значение на этапе сбора. Сюда входит дискриминатор прямого светорассеяния, количество событий CD45+ для сбора и правильное накопление синглетов флуоросфер.

Гистограмма 8 предназначена для дифференциации жизнеспособных и нежизнеспособных событий и проведения анализа жизнеспособных событий.

Создание регионов

Создайте следующие регионы:

1. Гистограмма 1 — создайте на гистограмме 1 прямолинейный регион A, включающий все лейкоциты CD45+ и исключающий тромбоциты, остатки эритроцитов и какие-либо скопления.
2. Гистограмма 1 — создайте на гистограмме 1 аморфную область E, которая будет включать лимфоциты (яркие CD45, низкое боковое светорассеяние).
3. Гистограмма 2 — создайте прямолинейный регион B на гистограмме 2, включающий все события CD34+. Установите на гистограмме 2 предел подсчета, равный 75 000 событий (события CD45+).
4. Гистограмма 3 — создайте аморфный регион C на гистограмме 3, включающий все объединенные события CD45dim.
5. Гистограмма 4 — создайте аморфный регион D на гистограмме 4, включающий все объединенные события со средним боковым рассеянием и средним или высоким прямым рассеянием.
6. Гистограмма 5 — создайте квадрант-регион I на гистограмме 5 для проверки нижнего предела экспрессии CD45 на событиях CD34+.
7. Гистограмма 5 — создайте аморфный регион H на гистограмме 5, чтобы окружить все флуоросферы Stem-Count или Flow-Count, включая дубликаты. Регион H должен быть расположен в верхнем правом углу гистограммы 5.

ЗАМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что регион H обозначен как регион AMORPHOUS (Аморфный).

8. Гистограмма 5 — создайте на гистограмме 5 прямолинейную область K (назовите ее «listgate – ») Установите границы области K на первой декаде логарифмической шкалы гистограммы двух параметров. Эта область K позволяет исключать дублирование отрицательных событий во время сбора, что позволит проанализировать 75 000 релевантных событий CD45+.

9. Гистограмма 6 — копируйте регион D с гистограммы 4 как регион F на гистограмме 6.
10. Гистограмма 7 — создайте прямолинейную область G на гистограмме 7, включающую только синглеты флуоросфер Stem-Count или Flow-Count. Область G можно отметить как «CAL» (Калибровка), чтобы обеспечить автоматический подсчет абсолютного количества гемопоэтических клеток-предшественников CD34+ HPC (дополнительные сведения приведены в руководстве по инструменту).
11. Гистограмма 8 — на гистограмме 8 создайте прямолинейную область, которая бы включала жизнеспособные лейкоциты (отрицательные события красителя жизнеспособности 7-AAD).

Создание гейтов

Создайте области селекции следующим образом:

1. Гистограмма 1 — выполните назначение «J» гистограмме 1 для отображения всех жизнеспособных событий. Если 7-AAD не используется, назначьте гистограмме 1 область «-H» для отображения всех событий, за исключением всех флуоросфер Stem-Count или Flow-Count, в том числе дублетов.
2. Гистограмма 2 — поставьте гистограмме 2 в соответствие регион «AJ» (регион «A» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить все жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) события CD34+.
3. Гистограмма 3 — поставьте гистограмме 3 в соответствие регионы «A», «B» и «J» (регионы «A» и «B» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить все жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) события CD45+ / CD34+.
4. Гистограмма 4 — поставьте гистограмме 4 в соответствие области «A», «B», «C» и «J» (области «A», «B» и «C» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить все образующие кластеры жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) события CD45+ / CD34+ со слабым боковым светорассеянием, исключая при этом тромбоциты и посторонние частицы. События из региона ABCDJ являются действительными жизнеспособными гемопоэтическими клетками-предшественниками (HPC) CD34+.
5. Гистограмма 5 — без селектора для отображения всех событий.
6. Гистограмма 6 — поставьте гистограмме 6 в соответствие область «EJ» (область «E» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить с помощью дискриминатора все жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) лимфоциты в порядке визуальной проверки.
7. Гистограмма 7 — выполните назначение «H» гистограмме 7, чтобы отобразить все флуоросферы Stem-Count или Flow-Count, включая дублеты.
8. Гистограмма 8 — выполните назначение «A» гистограмме 8 для отображения событий CD45+.

Настройки проточной цитометрии

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно настроен и оптимизирован для светорассеяния, а интенсивность флуоресценции детекторов FL1, FL2, FL3 и FL4 соответствует директивам производителя и лаборатории. Убедитесь, что настроена цветовая компенсация для стандартной работы. Дополнительные инструкции см. в руководстве по инструменту.
2. Обработайте тестовые пробирки на вортексе в течение 5 секунд.
3. Выполните сбор данных на проточном цитометре. Следует проанализировать не менее 75 000 событий CD45+.
4. Для анализа образцов: отрегулируйте дискриминатор и области, проанализировав содержимое пробирки с пробой 45/34/7-AAD #1. Сохраните протокол, и анализ пробирок 45/34/7-AAD #2 и 45/CTRL/7-AAD выполняйте уже без дальнейших корректировок.

Пример анализа

Гистограммы, содержащиеся в ПРИЛОЖЕНИИ, отображаются в порядке возрастания номеров, как показано в протоколе.

Расчет CD34+ HPC для образца

Число CD34+ HPC получают как среднюю величину статистических результатов области D для двух параллельных проб (то есть как 45/34/7-AAD #1 и 45/34/7-AAD #2).

Результаты CD34+ HPC считаются действительными в том случае, если количество результатов, полученных с помощью реагента CD45-FITC / IsoClonic Control-PE, составляет менее 10% от результатов CD34+ HPC.

1. Рассчитайте среднее значение для результатов, полученных из пробирок 45/34/7-AAD #1 и 45/34/7-AAD #2, по каждому образцу (то есть, выполните усреднение распечатанных статистических результатов по области D). Число CD34+ HPC не должно превышать 10% от средней величины двух параллельных проб. Результаты считаются действительными, если значение, полученное по контрольной пробирке 45/CTRL/7-AAD, составляет менее 10% от среднего значения по исследуемым пробиркам

ПРИМЕЧАНИЯ: Если среднее значение абсолютного количества CD34+ НРС, полученное по результатам параллельных испытаний, оказалось за пределами диапазона нормы (то есть превысило 10%), проверьте, правильно ли было произведено пипетирование; в особенности это касается флуоросфер Stem-Count и Flow-Count. Просмотрите отчеты проточной цитометрии и проверьте качество окрашивания и процессы лизирования в тестовых пробирках. Проверьте способ установки границ региона.

Если значение, полученное при использовании 45/CTRL/7-AAD, оказывается за пределами допустимых значений (т. е. превышает 10% от средней величины абсолютного количества, полученной в двух параллельных испытаниях), проверьте, правильно ли было произведено пипетирование; в особенности это касается флуоросфер Stem-Count или Flow-Count. Просмотрите отчеты проточной цитометрии и проверьте качество окрашивания и процессы лизирования в тестовых пробирках. Проверьте способ установки границ региона.

В случае необходимости повторите этап сбора данных, добавив пробирку BLANK (бланк) после первой дублирующей пробирки 45/34/7-AAD #1 и #2 и перед пробиркой 45/CTRL/7-AAD. В случае необходимости повторите цикл подготовки пробы с новыми тестовыми пробирками, добавив к ним пробирку BLANK (бланк). Выполните сбор и проанализируйте как новую, так и предыдущую серию пробирок. Сравните два результата. Если отсутствует соответствие, обратитесь в местное представительство компании Beckman Coulter.

2. Если проба была разведена, полученный результат ДОЛЖЕН быть умножен на коэффициент разведения (Dil). Окончательным полученным результатом будет абсолютное количество CD34+ НРС (клеток/мкл).

Абсолютное количество CD34+ НРС (клеток/мкл) = абсолютное количество CD34+ НРС согласно результатам распечатки (клеток/мкл) x коэффициент разведения
--

3. При анализе пакета продуктов афереза общее число CD34+ НРС пакета может быть рассчитано по следующей формуле:

Общее число CD34+ НРС (гемопозитических клеток-предшественников) в пакете = Абсолютное количество CD34+ НРС (клеток/мкл) x 10 ⁶ x объем пакета (л)

Где:

4. Для определения процентного содержания CD34+ НРС (гемопозитических клеток-предшественников CD34+) при расчете значения лейкоцитов CD45+ воспользуйтесь следующей формулой:

$$\% \text{ CD34+ НРС} = \frac{\text{Подсчет абсолютного количества CD34+ НРС (клеток/мкл)} \quad \text{(то есть результаты распечатки области D)}}{\text{Подсчет абсолютного количества лейкоцитов CD45+ (клеток/мкл)} \quad \text{(то есть результаты распечатки области A)}} \times 100$$

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Убедитесь, что проточный цитометр настроен корректно в соответствии с рекомендациями производителя, приведенными в руководстве по работе с инструментом. С целью оптимизации настроек светорассеяния и флуоресценции в инструменте для анализа проб, окрашенных реагентом моноклональных антител CD45-FITC / CD34-PE и реагентом CD45-FITC / Isoclonic Control-PE, были установлены целевые значения интенсивности.

Флуорохромы FITC (флуоресцеин изотиоционат), PE (фикоэритрин) и краситель 7-AAD (7-амино актиномицин) при излучении имеют различные длины волн, однако они характеризуются некоторым спектральным перекрытием, которое должно быть скорректировано электронной компенсацией. Оптимальные уровни компенсации могут быть рассчитаны на двухпараметрической гистограмме путем анализа пробы крови с добавлением контрольных клеток Stem-Trol, окрашенных реагентом Stem-Comp и красителем жизнеспособности 7-AAD, или подходящими компенсационными реагентами при использовании программного обеспечения СХР. В ходе этого анализа вносятся коррективы, дающие гарантию, что ни в одном квадранте дуальной окраски не произойдет окрашивания каким-либо индивидуальным флуорохромом.

Использование красителя 7-AAD (7-амино актиномицин D), разработанного для определения жизнеспособности, позволяет в ходе анализа с помощью проточной цитометрии выявить нежизнеспособные клетки с тем, чтобы произвести подсчет тех жизнеспособных клеток, которые представляют интерес для исследователя. Краситель впитывается мертвыми клетками (яркие события), что позволяет их впоследствии исключать из числа жизнеспособных клеток (негативные события) с помощью установки дискриминационного окна (см. гистограмму 8).

Перед анализом проб необходимо окрасить контроль для количественного определения (контрольные клетки Stem-Trol) с целью проверки реактивности антител.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Представленные производственные характеристики получены, исходя из использования реагентов Stem-Kit на проточном цитометре COULTER EPICS XL/XL-MCL с программным обеспечением System II. Примеры характеристик цитометра FC 500, работающего на программном обеспечении CXP, приведены в stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP).

Ожидаемые значения для диапазонов нормы

Для установления диапазона нормальных значений были собраны образцы нормальной цельной крови (n = 117) мужчин (n = 58) и женщин (n = 59). Это исследование было проведено в сторонней экспертной лаборатории. Для каждого образца были подготовлены параллельные испытания в соответствии с инструкциями на вкладыше в упаковку реагентов Stem-Kit. Была произведена клеточная сортировка вручную и выполнен анализ для получения значений CD45+, CD34+ и CD34%.

Статистический анализ предполагает негауссово распределение собранных данных. На основании этих результатов для анализа данных был избран непараметрический (робастный) подход. Были получены показатели CD45+, CD34+ и CD34%. Результаты для CD45+ и CD34+ выражаются в абсолютных количествах (клеток/мкл), а для CD34% в процентах к общему количеству лейкоцитов, см. таблицу ниже.

Нормальная цельная кровь: диапазоны значений нормы

Ручной метод (проверка робастности)	n	CD45+ (клеток/мкл)				CD34+ (клеток/мкл)				CD34+ (%)			
		Минимальное значение	Max.	Среднее	Станд. откл. (SD)	Минимальное значение	Max.	Среднее	Станд. откл. (SD)	Минимальное значение	Max.	Среднее	Станд. откл. (SD)
Ручной	117	2919,5	11240,0	6469,2	1635,2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Эти значения используются только в качестве примера. В каждой лаборатории должны быть установлены собственные диапазоны ожидаемых результатов с учетом проб нормальных доноров из числа местного населения.

Диапазон линейности

В каждом из 10 последовательных разведений для 2 типов проб — для периферической цельной крови с добавлением CD34+ и для свежей мобилизованной периферической крови — были произведены параллельные измерения. Для концентраций CD34+ HPC был достигнут динамический диапазон от 0 до 2 000 клеток/мкл и чувствительность для низких концентраций от 0 до 150 клеток/мкл. В соответствии с инструкциями, приведенными на вкладыше в упаковку реагентов Stem-Kit, были приготовлены пробы, которые были затем проанализированы на проточном цитометре COULTER EPICS XL/XL-MCL. Значения выражены как абсолютные количества (клеток/мкл). Результаты были проанализированы методом линейной регрессии для сравнения ожидаемых и измеренных абсолютных количеств; расчеты были произведены для средних значений параллельных измерений за исключением эндогенных CD34+ клеток. См. следующие таблицы.

Углы наклона линий регрессии на графиках абсолютных количеств CD34+ HPC определяют математические критерии линейности. Линейность подтверждается также минимальной потенциальной систематической ошибкой, по полученным при анализе точкам пересечения графиков с осью y. Ожидаемые абсолютные количества демонстрируют хорошую корреляцию с полученными значениями этого параметра.

Результаты анализа цельной крови с добавлением определяемого антигена CD34+

График приведен в Приложении.

Результаты периферической крови (мобилизованные клетки)

График приведен в Приложении.

Точность метода (таблицы)

(сравнение ожидаемых и полученных результатов)

Достоверность метода определяется как степень согласования между ожидаемыми и полученными результатами как для автоматизированного метода сортировки и анализа, так и для метода сортировки и анализа вручную. К свежей нормальной цельной периферической крови добавляли очищенные CD34+ клетки с доведением концентрации до 1 875 клеток/мкл. Подсчет клеток проверялся на гемоцитометре Малассе, после чего выполнялись последовательные разведения для получения растворов различных концентраций. Ожидаемые результаты сравнивали с полученными по средним значениям двух изменений, выполненных для каждого уровня разведения с помощью автоматической сортировки и анализа и сортировки и анализа вручную. Наклон линии и точка ее пересечения с осью ординат не выявляют статистически значимых различий между результатами сортировки и анализа и ожидаемыми результатами ни в случае ручного, ни в случае автоматического метода.

Точность метода — CD34+ (%)

График приведен в Приложении.

Точность метода — абсолютное количество CD34+ (клеток/мкл)

График приведен в Приложении.

Точность метода — общее количество лейкоцитов — CD45+ (клеток/мкл)

График приведен в Приложении.

Точность метода (сравнение результатов, полученных ручным и автоматическим методами)

В четырех сторонних экспертных лабораториях с использованием образцов свежей периферической цельной крови, свежего или оттаянного афереза, пуповинной крови и костного мозга была произведена сравнительная оценка точности автоматизированного и ручного методов системы stemONE. Был рассчитан 95% доверительный интервал (ДИ).

В соответствии с инструкциями, приведенными во вкладыше к упаковке реагентов Stem-Kit, в проточных цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL были подготовлены и проанализированы образцы свежей периферической цельной крови (n = 59 из трех лабораторий), свежих продуктов афереза (n = 51 из трех лабораторий), свежей пуповинной крови (n = 29 из двух лабораторий), свежего костного мозга (n = 33 из двух лабораторий), оттаянных продуктов афереза (n = 23 из одной лаборатории), оттаянной пуповинной крови (n = 31 из двух лабораторий) и оттаянного костного мозга (n = 20 из одной лаборатории). Была произведена ручная клеточная сортировка и выполнен анализ для получения показателей CD45+, CD34+ и CD34%.

Точность методов (рисунки)

Образцы свежей периферической цельной крови (n = 59)

График приведен в Приложении.

Образцы свежих продуктов афереза (n = 51)

График приведен в Приложении.

Образцы свежей пуповинной крови (n = 29)

График приведен в Приложении.

Свежие образцы костного мозга (n = 33)

График приведен в Приложении.

Образцы оттаянных продуктов афереза (n = 23)

График приведен в Приложении.

Образцы оттаянной пуповинной крови (n = 31)

График приведен в Приложении.

Оттаянные образцы костного мозга (n = 20)

График приведен в Приложении.

Воспроизводимость

Межлабораторная точность

Исследования проводились в пределах одного клинического учреждения тремя операторами, каждый из которых использовал отдельный проточный цитометр. Было идентифицировано три образца, представивших динамический диапазон CD34+ (0–2 000 клеток/мкл):

Нижний диапазон:	свежая, мобилизованная периферическая кровь
Средняя часть диапазона:	продукт афереза
Верхний диапазон:	продукт афереза

Эти образцы были разбиты на три аликвоты, каждый из трех операторов получил по одной аликвоте для каждого уровня (низкий, средний и высокий). В соответствии с инструкциями, приведенными на вкладыше в упаковку реагентов Stem-Kit из каждой аликвоты были приготовлены пробы (n = 10). Каждый оператор выполнял анализ на проточном цитометре EPICS XL, определяя методом ручной и автоматической сортировки и анализа содержание CD45+, CD34+ и процентное содержание CD34%. Полученные значения выражаются как в процентах (%) от общего числа лейкоцитов, так и в виде показателей абсолютного количества (клеток/мкл).

В нижеследующих таблицах представлены результаты исследования межлабораторной точности, где они сгруппированы по уровням. По результатам вычисления средних значений, стандартных отклонений и

коэффициентов вариации при проведении параллельных испытаний абсолютные количества CD45+ и CD34+, а также процентное содержание CD34 продемонстрировали низкую вариабельность. График приведен в Приложении.

Внутрилабораторное исследование точности

Из свежей периферической цельной крови, свежего костного мозга, а также свежих и оттаянных продуктов афереза и пуповинной крови, присланных из четырех сторонних экспертных лабораторий, был получен набор образцов, обеспечивший покрытие всего динамического диапазона исследования. В соответствии с инструкциями, содержащимися во вкладыше к упаковке реагентов Stem-Kit было приготовлено по десять проб каждого образца, которые затем были исследованы на проточных цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL с применением ручного метода сортировки и анализа для измерения значений CD45+, CD34+ и CD34%.

Значения CD45+, CD34+ и CD34%, представленные в нижеследующих таблицах, показывают, что метод анализа является воспроизводимым, как это подтверждается средними значениями, стандартными отклонениями и коэффициентами вариации, полученными в ходе этих измерений. Таблицы данных, представленные в ПРИЛОЖЕНИИ, демонстрируют показатели внутрилабораторной точности для испытания.

График приведен в приложении.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Ознакомьтесь со stemONE System Guide (Руководство по системе stemONE) с программным обеспечением системы stemONE и со stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP) с программным обеспечением системы stemCXP для получения информации по ограничениям, которые нужно соблюдать при использовании автоматического метода.

- Во избежание получения ошибочных результатов окрашенные и лизированные пробы необходимо хранить на льду и исследовать в проточном цитометре не позже чем через 1 час после добавления флуоросфер Stem-Count или Flow-Count.
- Реактивы нельзя разводить, делить на аликвоты или замораживать. Использовать только в оригинальной упаковке.
- Реагенты предназначены только для использования при проведении проточной цитометрии.
- Для достижения оптимального окрашивания следует соблюдать правила оттаивания замороженных образцов.
- При следующих условиях может оказаться, что не все эритроциты будут лизированы: наличие ядерных форм эритроцитов, отклонения в концентрации белка, или гемоглобинопатия. При этом результаты подсчета CD34% могут оказаться искусственно заниженными, поскольку нелизированные эритроциты будут сосчитаны как лейкоциты. Это не должно сказаться на измерении абсолютных количеств CD34+ и CD45+.
- В случае некоторых пациентов могут возникать особые проблемы ввиду измененных или очень низких количеств клеточных популяций.
- Результаты, полученные при проточной цитометрии, могут оказаться ошибочными, если дискриминационные окна были установлены неправильно.
- Реагенты Stem-Kit разработаны для того, чтобы с помощью красителя жизнеспособности 7-AAD определять жизнеспособные клетки НРС. Если в вашей лаборатории используются другие методы определения жизнеспособности, для обеспечения надлежащего качества сообщаемых результатов следуйте общим рекомендациям по работе в лаборатории и процедурам контроля качества, принятым в вашей лаборатории.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип, COULTER, COULTER COUNTER, CXP, CYTO-COMP, EPICS, Flow-Check, Flow-Count, Flow-Set, IsoClonic, QuickCOMP, Stem-Comp, Stem-Count, stemCXP, Stem-Kit, stemONE, Stem-Trol, System II, XL и XL-MCL являются товарными знаками Beckman Coulter, Inc. и зарегистрированы в USPTO (Бюро по регистрации патентов и товарных знаков США).