



# BD Plasma Count Kit

50 тестов на набор — кат. № 338331

Для подсчета остаточных лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в свежей плазме крови человека с применением проточной цитометрии

8/2010

23-13729-01



BD, логотип BD и другие товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © 2010 BD



**Becton, Dickinson and Company**  
**BD Biosciences**  
San Jose, CA 95131  
Тел.: 877-232-8995  
Факс: 408-954-2347  
ClinicalApplications@bd.com



**BENEX Limited**  
Rineanna House  
Shannon Free Zone  
Shannon, County Clare  
Ирландия  
Тел.: 353-61-472920  
Факс: 353-61-472907

**BD Biosciences**  
**Поддержка клиентов в Европе**  
Тел.: 322-400-9895  
Факс: 322-401-7094  
help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор BD Plasma Count Kit предназначен для диагностики in vitro с целью идентификации и подсчета с применением проточной цитометрии остаточных лейкоцитов (оБКТ), эритроцитов (оККТ) и тромбоцитов (оТБЦ) в свежей плазме крови человека.

## 2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Качество свежзамороженной плазмы (СЗП) может быть определено путем подсчета оБКТ, оККТ и оТБЦ до замораживания.<sup>1–3</sup> Применение проточной цитометрии обеспечивает быстрый количественный воспроизводимый метод идентификации и подсчета остаточных клеточных популяций.<sup>4–9</sup> Для определения абсолютных значений оБКТ, оККТ и оТБЦ в одной пробирке количественный анализ BD Plasma Count проводится с использованием пробирки BD Trucount.

## 3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Количественный анализ в одной пробирке осуществляется путем окрашивания определенного объема образца плазмы реагентами BD Plasma Count в отдельных пробирках BD Trucount. Меченые флуорохромом антитела специфично связываются с антигенами клеточной поверхности, в то время как краситель нуклеиновых кислот окрашивает ДНК и РНК всех ядродержащих клеток. Лиюфилизованный осадок в пробирке BD Trucount растворяется, высвобождая определенное число флуоресцентных частиц.

Во время анализа абсолютное значение (клеток/мкл) остаточных клеток в образце может быть определено путем деления количества остаточных клеточных событий на количество событий флуоресцентных частиц, а затем умножения результата на концентрацию частиц BD Trucount.<sup>4</sup>

## 4. РЕАГЕНТ

### Реагента в наборе достаточно для проведения 50 анализов

BD Plasma Count Kit состоит из следующих компонентов. Каждый из реагентов поставляется в фосфатно-солевом буфере (PBS) со стабилизатором и 0,1 % азида натрия.

- Флакон с реагентом А: тиазол оранжевый в стабилизационном буфере.
- Флакон с реагентом В: меченые FITC CD235a, клон GAR-2 (HIR-2), и меченые PerCP-Cy5.5 CD41a, клон HIP8, предварительно титрованные в стабилизационном буфере.
- Пробирки BD Trucount, каждая из которых содержит лиофилизированный осадок окрашенных флуоресцентом частиц размером 4,2 мкм.

Тиазол оранжевый является красителем нуклеиновых кислот, который проникает через клеточные мембраны и связывается с РНК и ДНК.<sup>10, 11</sup>

Антигликофорин А (CD235a) реагирует с сиалогликопротеином, присутствующим на мембране эритроцитов человека.<sup>12</sup> Гликофорин А представляет собой димерный трансмембранный комплекс с молекулярной массой 31 килодальтон (кДа) с карбокситерминальными концами, простирающимися в цитоплазму эритроцитов.<sup>13</sup>

Гликофорин А экспрессируется на эритроцитах человека, нормобластах и эритроидных клетках-предшественниках.<sup>14</sup> Зрелые безъядерные эритроциты обычно гликофорин А-положительны, но CD45-отрицательны.<sup>15</sup>

CD41a распознает кальций-зависимый комплекс  $\alpha\text{IIb}/\text{IIIa}$  молекулярной массой 140 кДа.<sup>16</sup>

Антиген CD41a (комплекс  $\alpha\text{IIb}/\text{IIIa}$ ) обнаружен на тромбоцитах и тромбоцитах-предшественниках. Он действует, как рецептор фибриногена, фактор фон Виллебранда (vWf), фибронектин и витронектин, и опосредует адгезию и агрегацию тромбоцитов.<sup>17—19</sup>

Антигликофорин А состоит из тяжелых цепей и легких kappa-цепей мышиного IgG<sub>2b</sub>.

CD41 состоит из тяжелых цепей и легких kappa-цепей мышиного IgG<sub>1</sub>.

### Меры предосторожности

- Критически важным является внесение точного объема образца. Откалибруйте пипетки, чтобы добавлять ровно 25  $\mu\text{л}$  и 50  $\mu\text{л}$  образца. Компания BD предлагает электронные пипетки, работающие в режиме обратного пипетирования (см. раздел «Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки» на стр. 4.) Если эта или аналогичные пипетки не применяются, используйте технику обратного пипетирования в соответствии с инструкцией производителя пипетки.
- Содержание частиц в пробирках BD Trucount разное для каждой партии. Критически важным является использование значения содержания частиц, которое указано на партии пробирок BD Trucount, используемых при подсчете абсолютного количества клеток. Не использовать пробирки из разных партий при проведении одного количественного анализа.
- Реагенты не замораживать и не подвергать воздействию прямого солнечного света при хранении или инкубации с клетками. Не подвергать флаконы с реагентом воздействию влаги.

- Не использовать реагенты, если наблюдаются какие-либо изменения внешнего вида. Осадок или обесцвечивание свидетельствуют о нестабильности или порче.
- Перед использованием пробирок BD Trucount следует проверять наличие в них осадка. Следует убедиться, что осадок не поврежден.
- Реагенты с антителами содержат в качестве консерванта азид натрия. Однако следует принимать меры для исключения микробного загрязнения, которое может приводить к ошибочным результатам.

**ОСТОРОЖНО!** Азид натрия вреден при приеме внутрь (R22). Хранить в недоступном для детей месте (S2). Держать вдали от пищи, напитков и корма для животных (S13). Использовать подходящую защитную одежду (S36). При попадании внутрь немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите данную упаковку или этикетку (S46). При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Азидные соединения при утилизации необходимо смывать большим количеством воды во избежание осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно возникновение взрывоопасных условий.

- **ОСТОРОЖНО!** Тиазол оранжевый может быть потенциальным канцерогеном. Обращаться с осторожностью. Раствор реагента содержит ядерный краситель, связывающий кислоту. Токсикологические свойства указанного красителя не исследовались. Использовать подходящую защитную одежду (S36). При вдыхании или проглатывании немедленно обратиться

к врачу. При попадании на кожу или в глаза смыть большим количеством воды.

- **ОСТОРОЖНО!** Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования<sup>20, 21</sup> и требуют утилизации с соблюдением надлежащих мер предосторожности в соответствии с федеральными, региональными и местными нормативами. Не выполнять пипетирование ртом. Использовать надлежащую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

### Хранение и обращение

- BD Plasma Count Kit следует хранить при температуре от 2 до 8 °С. Не использовать после даты истечения срока годности, указанной на этикетке.
- Избегать излишнего воздействия света на реагенты.
- Пробирки BD Trucount упакованы в два фольгированных пакета. Каждый пакет содержит 25 пробирок и влагопоглотитель. Пробирки BD Trucount следует хранить в оригинальном пакете при температуре от 2 до 25 °С. Во избежание конденсации пакет следует открывать только после достижения им комнатной температуры и тщательно запечатывать его сразу после извлечения пробирки. Проверьте влагопоглотитель при каждом открытии пакета. Если влагопоглотитель изменил цвет с голубого на бледно-лиловый, утилизируйте оставшиеся пробирки. Пробирки использовать в течение 1 часа после извлечения из пакета.

Пробирки остаются стабильными в течение 1 месяца после вскрытия пакета. Не использовать после истечения срока годности, указанного на упаковке.

## 5. ПРИБОР

BD Plasma Count Kit предназначен для использования с проточным цитометром, оборудованным соответствующими техническими средствами и программным обеспечением. Компания BD рекомендует проточные цитометры BD FACSCalibur™, BD FACSort™ или BD FACScan™. Однако при использовании других платформ также можно получить результаты. Цитометр должен быть оснащен лазером 488 нм и быть способным определять рассеяние света (прямое и боковое) и трехцветную флуоресценцию на следующих длинах волн.

- 515—545 нм (FL1).
- 562—607 нм (FL2).
- > 650 нм (FL3 или FL4 в зависимости от производителя прибора).

Цитометр должен обладать возможностью установки порогового уровня или дискриминации с использованием канала FSC. С данным прибором также можно использовать загрузчик BD FACST™ Loader.

Компания BD рекомендует использовать частицы BD Calibrite™ beads и программное обеспечение BD FACSComp™ software версии 4.0 или более поздней для настройки напряжений фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсации флуоресценции, а также проверки чувствительности прибора перед использованием. Для проточных цитометров производства других компаний (кроме BD) необходимо, следуя рекомендациям производителя, настроить цитометр на режим трехцветного сбора и обработки данных.

## 6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Отобрать образцы плазмы в соответствии с инструкциями производителя. Хранить образцы плазмы при комнатной температуре (от 20 до 25 °С) при постоянном перемешивании до полной готовности к окрашиванию. Использовать свежие образцы плазмы для подсчета остаточных клеток в течение 18 часов после забора. Для анализа необходимо не менее 200 мкл плазмы.

### Мешающие факторы

- Не использовать ранее зафиксированную и хранившуюся плазму.
- Образцы, охлажденные перед окрашиванием, могут давать искаженные результаты.
- Не использовать гемолизированные, липемические или свернувшиеся образцы.
- Во время хранения в окрашенных образцах увеличивается агглютинация ККТ. Поэтому следует получить образцы в течение 1 часа после окрашивания.

## 7. ПРОЦЕДУРА

### Поставляемые реагенты

- Флакон с реагентом А
- Флакон с реагентом В
- Пробирки BD Trucount

### Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки

- Одноразовые полистироловые пробирки с крышками BD Falcon™ 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные.
- Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD Electronic Pipette, BD кат. № 646539 или эквивалентные).
- Вихревая мешалка «вортекс» и вальцовый смеситель.

- Калибровочные частицы BD Calibrite™ beads (BD кат. № 349502).
- Калибровочные частицы BD Calibrite PerCP-Cy5.5 (BD кат. № 345036).
- Проточная жидкость BD FACSTeam™ sheath fluid (BD кат. № 342003) или эквивалентная.
- Раствор BD CellWASH™ (BD кат. № 349524) или промывочный фосфатно-солевой буфер (PBS) с 0,1 % азида натрия.
- Раствор BD FACSTeam™ Clean (кат. № 340345).
- Раствор BD FACSTeam™ Rinse (кат. № 340346).

### Внутренний контроль качества

Компания BD рекомендует ежедневно выполнять анализ контрольного образца для оптимизации настроек прибора и в целях контроля качества системы.<sup>22</sup>

**NOTE** Коммерческие контрольные образцы не были проверены на использование с количественным анализом BD Plasma Count.

### Окрашивание клеток

**ВАЖНО.** Перед началом процедуры окрашивания выполните следующие действия:

- Перед использованием дайте флакону с реагентом А прогреться до комнатной температуры.
- Во избежание усиления фоновых сигналов в окрашенных образцах плазмы перед использованием отфильтруйте буфер (например, BD CellWASH или PBS) через фильтр 0,2 мкм.

**CAUTION:** Пипеттируйте образец и реагенты на стенку каждой пробирки чуть выше сеточки из нержавеющей стали. Если образец останется на стенке пробирки, он не окрасится реагентом. Не прикасайтесь к осадку.

1. Для каждого образца компонентов крови в промаркированные пробирки BD Falcon 12 x 75 мм добавьте не менее 200 мкл свежей плазмы.

**NOTE** Для каждого образца используйте новый наконечник.

2. Для каждого образца компонентов крови извлеките из фальгированного пакета пробирку BD Trucount и соответствующим образом промаркируйте.

**NOTE** Перед использованием следует удостовериться в том, что осадок частиц интактен и находится в металлической сеточке на дне каждой пробирки. Если это не так, утилизируйте пробирку и используйте новую.

3. При помощи откалиброванной пипетки перенесите в каждую промаркированную пробирку соответствующее количество образца компонентов крови (25 или 50 мкл [см. табл. 1]).

**NOTE** Подсчет точности (выраженный в виде коэффициента вариации [CV]) определяется количеством подсчитанных событий. Определение меньшего количества событий увеличивает значение CV. Коэффициент CV зависит от концентрации и объема образца. Поэтому анализ более высокой концентрации клеток и подсчет большего количества клеток уменьшает значение CV.<sup>23</sup> Компания BD рекомендует при выборе количества образца руководствоваться необходимой для конкретного приложения точностью (табл. 1).

Табл. 1. Количество образца, используемое для подсчета различных диапазонов оБКТ в плазме

	0,5—50 оБКТ/мкл	> 50—500 оБКТ/мкл
Количество образца	50 мкл	25 мкл

- Добавьте 100 мкл реагента А в каждую пробирку BD Trucount.
- Добавьте 20 мкл реагента В в каждую пробирку BD Trucount.
- Закройте пробирки и аккуратно перемешайте в вортексе.
- Инкубируйте пробирки в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре.
- Для остановки процесса окрашивания добавьте 1 мл отфильтрованного раствора BD CellWASH в каждую пробирку.
- Закройте пробирки и осторожно перемешайте их содержимое на вортексе.

Теперь клетки готовы для анализа в проточном цитометре. Образцы необходимо защищать от прямого воздействия света. Перед получением данных перемешайте содержимое каждой пробирки на вортексе. При использовании BD FACS Loader перемешайте содержимое каждой пробирки на вортексе непосредственно перед их размещением на карусели загрузчика.

**NOTE** Не размещать на подставке загрузчика количество пробирок, которое не сможет быть обработано в течение 1 часа.

Если окрашенные образцы не будут обрабатываться сразу же после приготовления, их следует хранить в темноте при температуре от 2 до 8 °C

не более 1 часа. Анализировать образцы в течение 1 часа после приготовления. Непосредственно перед анализом тщательно перемещать на вортексе.

### Настройка прибора

В этом разделе представлены инструкции по настройке прибора. По любым вопросам обращайтесь к представителю компании BD в вашем регионе или в региональный офис. В Европе обращайтесь в научную поддержку BD Biosciences (Scientific Support) по телефону +32-(0)-2-401-70-93 или посредством электронной почты на адрес [help.biosciences@bd.com](mailto:help.biosciences@bd.com).

### Подготовка к настройке прибора

Перед анализом окрашенных образцов плазмы в проточном цитометре выполните следующие действия:

- Промойте проточную камеру прибора раствором BD FACS Clean, а затем раствором BD FACS Rinse. Для проточных цитометров BD обратитесь к руководству по эксплуатации Вашего цитометра.
- Проверьте уровень BD FACSFlow sheath fluid. Общий уровень шума не должен превышать 30—45 событий в секунду при установке FSC в режим регистрации событий и настроенном пороговом значении FSC на канал 100—150. При превышении рекомендуемого уровня шума используйте новый контейнер с проточной жидкостью. Если проблема нерешена, замените фильтр проточной жидкости.

### Настройка прибора

При использовании проточных цитометров производства других компаний (кроме BD) для регулирования компенсации используйте калибровочные

частицы BD Calibrite beads и частицы PerCP-Cy5.5 или калибровочные частицы BD Calibrite 3. Убедитесь, что немеченные частицы располагаются в левом нижнем квадранте, отображающем двумерную флуоресценцию.

При использовании проточных цитометров производства компании BD, компания BD рекомендует применять калибровочные частицы BD Calibrite (FITC, PE и PerCP-Cy5.5) с BD FACSComp software, используя настройки трехцветного лизирования без промывания (LNW). Для дополнительной информации см. инструкцию-вкладыш упаковки *BD Calibrite beads* и *Руководство пользователя BD FACSComp software*.

## Анализ образцов

Для подсчета остаточных клеток компания BD рекомендует использовать программное обеспечение BD CellQuest™ Pro software.

**NOTE** Для того чтобы обеспечить полное ресуспендирование клеток и частиц, следует медленно перемешать образцы на вортексе непосредственно перед анализом.

1. В BD CellQuest software создайте документ «Эксперимент» (Experiment), содержащий пять точечных графиков сбора и анализа данных со следующими параметрами: FSC и SSC, FL1 и FL2, FL2 и FL3, FSC и FL3, FL1 и FL3.
2. После использования BD FACSComp software для настройки цитометра загрузите файл CalibFile.LNW и произведите следующие изменения:
  - Установите FSC (P1) и SSC (P2) в режим регистрации событий.
  - Установите пороговое значение FSC на канал 100—150.

3. Перемешайте первый образец в вортексе и установите его в цитометр.
4. Установите уровень контроля жидкости на «HI» и начните получать данные в режиме настройки.

При использовании в процессе получения данных BD FACS Loader для подробной информации обратитесь к *Руководству пользователя BD FACS Loader*.

5. Если необходимо, откорректируйте настройки прибора.
6. Отсановите получение данных и сохраните оптимизированные настройки прибора.
7. На соответствующих графиках обозначьте области вокруг популяции частиц.

График	Область
FL1 и FL2	R1
FL2 и FL3	R2
FL1 и FL3	R3

Области R1, R2 и R3 см. на рис. 1а.

8. В списке гейтов определите гейт частиц, как R1 и R2 и R3, и измените метку с *G4* на *Beads*.
9. В окне Acquisition & Storage («Получение и хранение данных») измените следующие настройки:
  - Выберите *Beads* («Частицы») из выпадающего меню *Acquisition stops when 10,000 events are acquired* («Остановить получение данных по достижению 10 000 событий»).
  - Убедитесь, что разрешение прибора установлено на 1024 и установлены флажки P1, P2, P3, P4 и P5.
10. Получите данные образцов, сохраните их.

## Анализ данных

### Настройка гейтов ОБКТ

1. На соответствующих графиках обозначьте области вокруг популяции лейкоцитов. См. рис. 1a и 1b.

График	Область
FSC и SSC	R4
FL1 и FL2	R5
FL2 и FL3	R6
FL1 и FL3	R7

2. В списке гейтов измените метку *G9* на *rWBC* (оБКТ) и объедините следующие области:

$$rWBC = R4 \text{ и } R5 \text{ и } R6 \text{ и } R7$$

3. Установите флажок *Hilite* на *rWBC*.

### Настройка гейтов ОККТ

1. На соответствующих графиках обозначьте области вокруг популяции ККТ. Рис. 1a и 1b.

График	Область
FSC и SSC	R8
FL1 и FL2	R9

2. В списке гейтов измените метку *G12* на *rRBC* (оККТ) и объедините следующие области:

$$rRBC = R8 \text{ и } R9$$

**NOTE** Все гликофорин А-FITC положительные эритроциты отображаются в R9. Морфологически измененные эритроциты не отображаются в R8 и поэтому исключены из расчета оККТ определением гейтирования по оККТ.<sup>5, 7, 24</sup>

### Настройка гейтов оТБЦ

1. На соответствующих графиках обозначьте области вокруг популяции ТБЦ. См. рис. 1a и 1b.

График	Область
FSC и FL3	R10
FL1 и FL3	R11

2. В списке гейтов измените метку *G15* на *rPLT* (оТБЦ) и объедините следующие области:

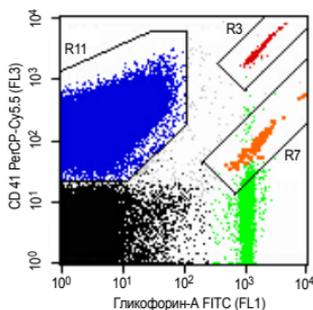
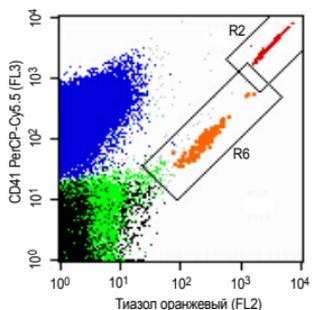
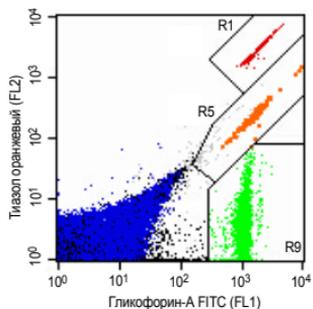
$$rPLT = R10 \text{ и } R11$$

### Просмотр графиков анализов

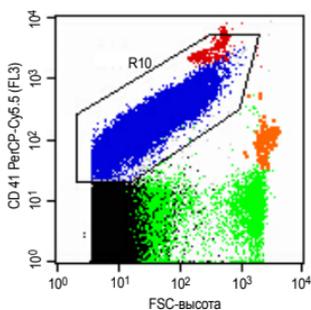
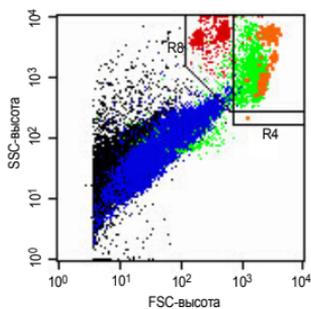
1. Упорядочьте гейты в списке гейтов в порядке убывания: *Beads*, *rWBC*, *rRBC*, *rPLT*.

Графики анализа должны выглядеть, как изображено на рис. 1a и 1b.

2. *Display Region* («Область отображения») и *Gate statistics* («Статистика гейта») для данных образца.
3. Подсчитайте абсолютные значения. (См. Расчет абсолютного значения on page 9.)



**Рис. 1а. Репрезентативный график, отображающий принцип гейтирования для количественного анализа BD Plasma Count**



**Рис. 1b. Репрезентативный график, отображающий принцип гейтирования для количественного анализа BD Plasma Count**

## 8. РЕЗУЛЬТАТЫ

### Расчет абсолютного значения

Абсолютное количество остаточных клеток определяется путем деления количества подсчитанных событий остаточных клеток на количество подсчитанных событий флуоресцентных частиц и умножения этого результата на концентрацию частиц.

Для расчета абсолютного значения остаточных клеток в популяции остаточных клеток используйте следующее уравнение.

$$\frac{\text{кол-во остаточных клеток (GX)}}{\text{кол-во частиц (G4)}} \times \frac{\text{частиц в пробирке**}}{\text{количество образца}} = \text{остаточных клеток/мл}$$

\* GX обозначает гейт по оБКТ, оККТ или оТБЦ.

\*\* Это значение указано на этикетке пакета с пробирками BD Trucount и в различных партиях может варьироваться.

На рис. 2 изображены статистические данные для анализа остаточных клеток в образце плазмы и расчеты оБКТ, оККТ и оТБЦ.

Gate Statistics	
File: FFP sample.demo	
Acquisition Date: 18-Mar-04	
Gated Events: 182478	
Total Events: 182478	
Gate	Events
Beads	10000
rWBC	140
rRBC	2086
rPLT	129720

$$\frac{140}{10\,000} \times \frac{48\,554}{25\ \text{мкл}} = 27\ \text{оБКТ/мл плазмы}$$

$$\frac{2086}{10\,000} \times \frac{48\,554}{25\ \text{мкл}} = 405\ \text{оККТ/мл плазмы}$$

$$\frac{129\,720}{10\,000} \times \frac{48\,554}{25\ \text{мкл}} = 25\,194\ \text{оТБЦ/мл плазмы}$$

Рис. 2. Статистические данные и расчеты для анализа оБКТ, оККТ и оТБЦ в образце плазмы

## 9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Рабочие характеристики не были установлены на цитометрах системы «stream-in-air».
- Ядросодержащие эритроциты содержат нуклеиновые кислоты и могут определяться в данном методе

анализа как остаточные БКТ. Однако ядросодержащие эритроциты не присутствуют в крови здоровых людей в определяемых количествах. Их ожидаемая частота в свежей плазме будет еще ниже и, следовательно, менее интерферируема.<sup>6</sup>

- Как и для любого анализа, который включает статистику расчета, подсчитанное количество событий может повлиять на результат.<sup>23</sup> Компания BD рекомендует при анализе плазмы после лейкоредукции накапливать как минимум 100 000 общих событий, или как минимум 10 000 частиц BD Trucount для безлейкоцитной плазмы.
- Образцы, содержащие > 38 000 оТБЦ, не были проверены для данного количественного анализа.

## 10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Точность

Основываясь на серии комбинированных разведений в соответствии с правилами ICH и NCCLS, были трижды протестированы пять разных уровней концентрации в течение пяти дней.<sup>25—27</sup> Целевые показатели для пяти уровней концентрации были получены при разведении одного исходного клеточного раствора, измеренного на автоматическом счетчике клеток Sysmex F-820. Очищенные образцы БКТ, ККТ и ТБЦ были введены в бесклеточную плазму. Бесклеточная плазма использовалась в качестве контрольной пробы. Каждый из пяти дней подготавливались свежие образцы.

Подготовленные образцы окрашивались в соответствии с процедурой окрашивания клеток, описанной на page 5. Результаты см. в табл. 2, средние значения см на рис. 3.

Табл. 2. Точность количественного анализа BD Plasma Count для каждого из уровней концентрации (N = 15)

Тип клеток	Уровень (клеток/мк л)	Среднее значение (клеток/мк л)	SD <sup>a</sup> (клеток/мк л)	%CV <sup>b</sup>
БКТ	50	51	3,9	7,5
	275	291	15,0	5,2
	500	508	43,8	8,6
	725	758	40,5	5,3
	950	967	58,6	6,1
ККТ	600	606	55,6	9,2
	3300	2892	306,8	10,6
	6000	4737	572,5	12,1
ТБЦ	2000	1995	215,7	10,8
	11 000	10 858	952,8	8,8
	20 000	19 566	1807,7	9,2
	29 000	28 446	2425,6	8,5
	38 000	36 546	3143,6	8,6

a. SD = стандартное отклонение.  
b. CV = коэффициент вариации.

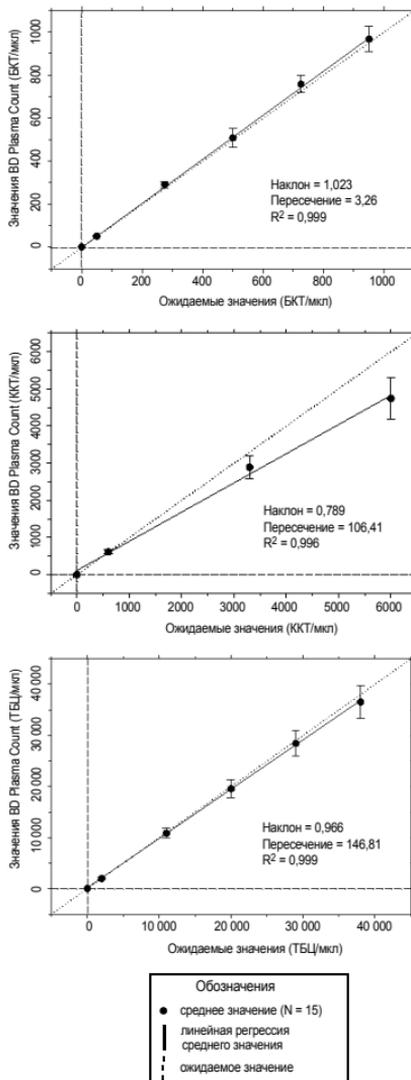


Рис. 3. Линейность количественного анализа BD Plasma Count\*

\* Средние значения для каждого типа клеток на пяти различных уровнях взяты из табл. 2.

## Линейность

Основываясь на на серии комбинированных разведений в соответствии с правилами ICH и NCCLS, были трижды протестированы пять разных уровней концентрации в течение пяти дней.<sup>25–27</sup> Целевые показатели для пяти уровней концентрации были получены при разведении одного исходного клеточного раствора, измеренного на автоматическом счетчике клеток Sysmex F-820. Очищенные образцы БКТ, ККТ и ТБЦ были введены в бесклеточную плазму. Бесклеточная плазма использовалась в качестве контрольной пробы. Каждый из пяти дней подготавливались свежие образцы. Подготовленные образцы окрашивались в соответствии с процедурой окрашивания клеток, описанной на page 5. Результаты линейности см. на рис. 3.

**NOTE** Приведенные значения оККТ показывают эффект постепенной агглютинации с увеличением концентрации, что приводит к недооценке оККТ при концентрациях выше 3000 клеток/мкл. Статистика приведена в табл. 2.

## Стабильность

Окрашенные реагентами BD Plasma Count образцы для подсчета трех типов клеток в свежемороженой плазме были стабильными в течение 1 часа после окрашивания при хранении в темноте при температуре 4 °С.

## Точность

Общее сравнение и Ожидаемые значения

В одном из исследований точность результатов клеточной концентрации количественного анализа BD Plasma Count сравнивалась с точностью ожидаемых значений подсчета эритроцитов,

лейкоцитов и тромбоцитов.<sup>5</sup> Образцы были получены при разведении одного исходного клеточного раствора, измеренного на счетчике клеток крови (модель Sysmex F-820). Исходный раствор подготовлен путем введения БКТ, ККТ и ТБЦ в бесклеточную плазму. Результаты средних значений приведены в табл. 2 на page 11.

Результаты БКТ и ТБЦ из проточного цитометра сравнивались непосредственно с ожидаемыми значениями. Приведенные значения ККТ показывают эффект постепенной агглютинации с увеличением концентрации, что приводит к недооценке ККТ при концентрациях выше 3300 клеток/мкл (отклонение > 10 %).<sup>5</sup>

Табл. 3. Точность количественного анализа BD Plasma Count и ожидаемый диапазон<sup>a</sup> для каждого типа клеток (N = 90)

Тип клеток	Диапазон (клеток/мкл)	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Корреляция (R <sup>2</sup> )
БКТ	0–950	1,023	3,26	0,999
ККТ	0–6000	0,789	106,41	0,996
ТБЦ	0–38 000	0,966	146,81	0,999

a. Уровни концентрации были получены при разведении одного исходного клеточного раствора, измеренного на автоматическом счетчике клеток Sysmex F-820.

## Количественный анализ BD Plasma Count и показания микроскопа

Было проведено сравнение количественного анализа BD Plasma Count и количественного анализа Фукса-Розенталя на предмет точности подсчета количества остаточных эритроцитов. В соответствии с процедурой, описанной на page 5, было окрашено в общей сложности 79 образцов здоровых доноров. Абсолютные значения оККТ определялись путем подсчета под

микроскопом, используя счетную камеру с сеткой Фукса-Розенталя, и методом проточной цитометрии. Результаты исследования показали отличные сравнительные характеристики определения методом микроскопии и с использованием проточной цитометрии. Результаты представлены в табл. 4.

приведены в табл. 4 и табл. 5, на рис. 5 изображены графики.

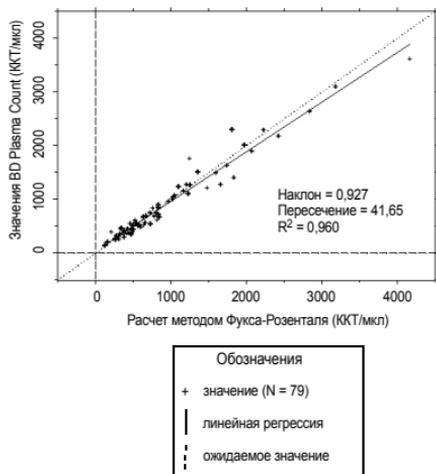


Рис. 4. Точность количественного анализа BD Plasma Count и подсчета методом Фукса-Розенталя

### Исследование низкого диапазона

В данном исследовании сравнивалась точность результатов низкого диапазона БКТ и ККТ, полученных в результате количественного анализа BD Plasma Count, с приблизительными количествами клеток, полученными при разведении одного исходного клеточного раствора, измеренными с помощью счетчика клеток Sysmex F-820. Образцы были подготовлены, разбавлены и проанализированы с помощью тех же методов, что и при общем сравнительном исследовании. Результаты

Табл. 4. Точность количественного анализа BD Plasma Count при определении БКТ и ККТ в низком диапазоне (N = 15)

Тип клеток	Уровень (клеток/мл л)	Среднее значение (клеток/мл л)	SD <sup>a</sup> (клеток/мл л)	%CV <sup>b</sup>
БКТ	0,6	0,7	0,28	40,4
	1,95	2,4	0,35	14,5
	3,30	3,7	0,69	18,8
	4,65	5,7	0,93	16,3
	6,00	6,0	1,13	18,7
ККТ	600	597	48,80	8,2
	1950	1625	155,14	9,6
	3300	2707	203,46	7,5
	4650	3215	226,27	7,0
	6000	4472	563,16	12,6

a. SD = стандартное отклонение.  
b. CV = коэффициент вариации.

Табл. 5. Точность количественного анализа BD Plasma Count и ожидаемый низкий диапазон<sup>a</sup> каждого типа клеток (N = 90)

Тип клеток	Диапазон (клеток/мл л)	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Корреляция (R <sup>2</sup> )
БКТ	0—6,0	1,052	0,199	0,979
ККТ	0—6000	0,716	133,47	0,990

a. Уровни концентрации были получены при разведении одного исходного клеточного раствора, измеренного на счетчике клеток Sysmex F-820.

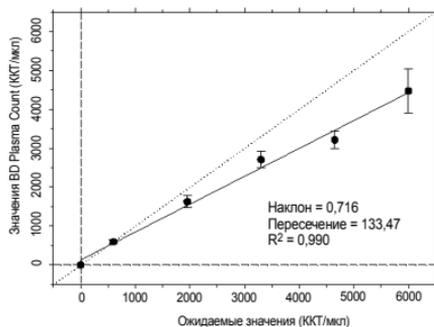
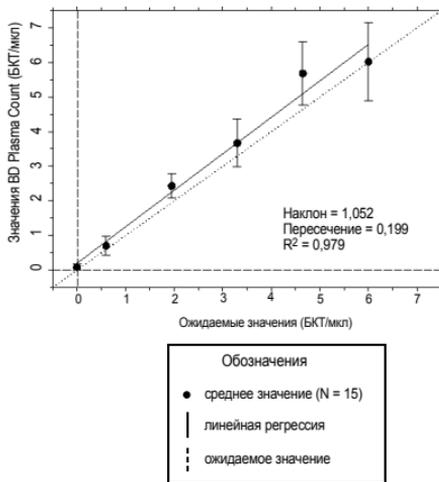


Рис. 5. Линейность количественного анализа BD Plasma Count и ожидаемого низкого диапазона\*  
\* Средние значения для каждого типа клеток на пяти различных уровнях взяты из табл. 4.

## ГАРАНТИЯ

Для продаваемого согласно данным условиям продукта гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке на момент доставки заказчику. Не существует никаких гарантий, явных или подразумеваемых, выходящих за рамки описания на этикетке продукта. Вся ответственность компании BD ограничивается либо заменой продуктов, либо возмещением цены покупки. BD не несет ответственности за повреждение имущества, получение травм или экономический ущерб, вызванные продуктом.

## ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разрешение между дебрисом и остаточными клетками	Неподходящие настройки прибора	Выполнить соответствующие процедуры настройки прибора; при необходимости оптимизировать настройки.
Слабое или тусклое окрашивание либо отсутствуют остаточные клетки	Несоответствующие характеристики реагентов	Хранить реагенты BD Plasma Count при температуре 2—8 °C и не использовать после истечения срока годности. Повторить окрашивание, используя новый реагент.
	Недостаточное количество реагента	Повторить окрашивание со свежим образцом. Использовать рекомендуемые объемы. Образцы следует тщательно перемешивать с реагентами.
	Клетки анализировались позднее чем через 1 час после окрашивания	Повторить окрашивание со свежим образцом. Провести анализ без задержки либо хранить образцы в темноте при температуре 4 °C не более 2 часов.
Частиц BD Trucount мало или нет вообще	Неподходящий состав среды (нет азида)	При использовании в качестве среды разведения образца, использовать азид в PBS.
	Поврежден или отсутствует осадок частиц	Перед использованием визуально проверить пробирку BD Trucount. Использовать пробирки в течение 1 часа после извлечения из пакета. Не использовать после истечения срока годности.
	Неисправный цитометр	Проверить и исправить прибор.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components.* (10th ed.) Council of Europe Publishing; 2004:260.
2. *Guidelines for the production of blood and blood components and for the use of blood products (Haemotherapie).* Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz; 2000;43:555–589.
3. Heiden M, Seitz R. Quality of therapeutic plasma-requirements for marketing authorization. *Thromb Res.* 2002;107 Suppl 1:47-51.
4. Vowells S, Cadden M, Wagner C, Nuñez R. *Detection and Enumeration of Residual White Blood Cells in Leucoreduced Red Blood Cell and Platelet Products Using the LeucoCOUNT Kit.* Becton, Dickinson, and Company; 1998.
5. Lambrecht B, Spengler HP, Bauerfeind U, Mohr H. Simultaneous quantitation of contaminating leukocytes, erythrocytes, and platelets in fresh frozen plasma in a single tube assay by flow cytometry. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine.* 2001;28 Suppl 1:52–53.
6. Jilma-Stohlawetz P, Marsik C, Horvath M, Sigmeth H, Hocker P, Jilma B. A new flow cytometric method for simultaneous measurement of residual platelets and RBCs in plasma: validation and application for QC. *Transfusion.* 2001;41(1):87–92.
7. Krailadsiri P, Seghatchian J. Residual red cell and platelet content in WBC-reduced plasma measured by a novel flow cytometric method. *Transfusion and Apheresis Science.* 2001;24:279–286.
8. Frey B, Furrer M, Wettstein M, Minder U. Quantification of residual red blood cells in platelet concentrates and fresh frozen plasma by flow cytometry. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine.* 2001;28 Suppl 1:53.
9. Pichler J, Printz D, Scharner D, Trbojevic D, Siekmann J, Fritsch G. Improved flow cytometric method to enumerate residual cells: minimal linear detection limits for platelets, erythrocytes, and leukocytes. *Cytometry.* 2002;50(4):231-237.
10. Lee LG, Chen CH, Chiu LA. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry.* 1986;7(6):508-517.
11. Terstappen LW, Loken MR. Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials. *Cytometry.* 1988;9(6):548-556.
12. Gahmberg CG, Jokinen M, Andersson LC. Expression of the major sialoglycoprotein (glycophorin) on erythroid cells in human bone marrow. *Blood.* 1978;52:379-387.

13. Wise GE, Oakford LX, Dzandu JK. Ultrastructure of a transmembrane glycoprotein, glycophorin A. *Tissue & Cell*. 1988;20:219-227.
14. Rogers CE, Bradley MS, Palsson BO, Koller MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow perfusion cultures: erythroid development and relationship with burst-forming units-erythroid. *Exp Hematol*. 1996;24:597-604.
15. de Vries E, De Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, et al. Correction for erythroid cell contamination in microassay for immunophenotyping of neonatal lymphocytes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1999;80:226-229.
16. von dem Borne AEGKr, Modderman PW, Admiraal LG, Nieuwenhuis HK. Platelet antibodies, the overall results. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:951-977.
17. de Haas M, von dem Borne A. CD41/CD61 Workshop Panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGK, et al, eds. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Garland Publishing, Inc.; 1997:643-645.
18. Feng R, Shimazaki C, Inaba T, et al. CD34<sup>+</sup>/CD41a<sup>+</sup> cells best predict platelet recovery after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998;21:1217-1222.
19. Jennings LK, Ashmun RA, Wang WC, Dockter ME. Analysis of human platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. *Blood*. 1986;68:173-179.
20. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections—Second Edition; Approved Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2001. NCCLS document M29-A2.
21. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
22. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes: Approved Guideline*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H42-A.
23. Dzik S. Counting Low Numbers of Leukocytes in Leukoreduced Blood Components. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine*. 1999;26:62-65.
24. Linneweber J, Chow TW, Takano T, et al. Direct detection of red blood cell fragments: a new flow cytometric method to evaluate hemolysis in blood pumps. *Asaio J*. 2001;47(5):533-536.
25. *Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002. NCCLS document EP10-A2.
26. ICH SC. Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures. Presented at the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; www.ich.org.
27. ICH SC. Q2B: Validation of Analytical Procedures. Presented at the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; www.ich.org.