

M2365-3



СОДЕРЖАНИЕ

раздел

1 _____

Введение

раздел

2 _____

ОБЩИЕ ПРОЦЕДУРЫ

- 2.1 Подготовка Образцов
- 2.2 Выбор Cytopad
- 2.3 Выбор Объема Образца
- 2.4 Варианты Загрузки Образца
- 2.5 Предварительное увлажнение
- 2.6 Фиксация *In Situ*
- 2.7 Выбор Скорости
- 2.8 Выбор Времени Пробега
- 2.9 Выбор Ускорения

ССЫЛКИ

раздел

3 _____

ПОИСК НЕИСПРАВНОСТЕЙ



Данное руководство описывает методы обработки широкого спектра образцов в роторе Cytopro цитоцентрифуги. Эти методы применяются, если Вы используете ротор с Aerospray® Slide Stainer цитоцентрифугой или с моделью 7620 Cytopro® цитоцентрифугой.

Успешное центрифугирование требует внимательного изучения характеристик образца, и индивидуальных условий приготовления. Это руководство определяет эти факторы и предлагает методы, чтобы помочь Вам достичь желаемых результатов.

Руководство разделено на три раздела:

Раздел 1. Знакомит Вас с этим руководством (введение)

Раздел 2. Использует **Общую Таблицу Процедур** (показанную и в этом руководстве и в Руководстве Пользователя Cytopro) как структуру, чтобы помочь Вам подготовить образцы и выбрать условия обработки в Cytopro.

Раздел 3. Обеспечивает информацию о **Поиске неисправностей**, чтобы помочь Вам найти и разрешить любые проблемы.

Раздел 2 ОБЩИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Этот раздел базируется на Общей Таблице Процедур (показанной ниже). Такая же таблица показана в Руководстве Пользователя Cytopro. Всесторонняя информация для каждой категории перечислена в таблице этого раздела. Используйте эти данные как общее руководство. Вследствие возможных различий образцов Вам может понадобиться самостоятельно отрегулировать параметры.

Гематология (воздушная фиксация)	Подготовка образца	Цитопрокладка	Объем Образца (мл)	Положение загрузки	Предварительное увлажнение (мл)	Фиксация In Situ (мл)	Скорость (об/мин)	Время (минуты)	Ускорение
CSF (цереброспинальная жидкость)	e, f	Желто-коричневая	0,2	Лунка	0-0,1	нет	1000	3-5	Низкое
Моча	a, d, e, f	Желто-коричневая	0,2	Лунка	0-0,1	нет	1000	3-5	Высокое
Синовиальный	c, d, e, f	Белая	0,2	Лунка	0-0,1	NA	1000	3-5	Высокое
Мокрота	c, e	Белая	0,2	Лунка	0-0,1	NA	1000	3-5	Высокое
Жидкости из полости	a, c, d, e, f	Желто-коричневая	0,2	Лунка	0-0,1	NA	1000	3-5	Высокое
Смывы	a, d, e, f	Желто-коричневая	0,2	Лунка	0-0,1	NA	1000	3-5	Высокое
Микробиология (воздушная фиксация)									
CSF(цереброспинальная жидкость)	e, f	Желто-коричневая	0,2	Лунка	0-0,1	Нет	1000	3-5	Низкое
Моча	a, d, e, f	Желто-коричневая	0,2	Лунка	0-0,1	Нет	1000	3-5	Высокое
Синовиальный	c, d, e, f	Белая	0,2	Лунка	0-0,1	Нет	1000	3-5	Высокое
Мокрота	c, e, f	Белая	0,2	Лунка	0-0,1	Нет	1000	3-5	Высокое
Жидкости из полости	a, c, d, e, f	Желто-коричневая	0,2	Лунка	0-0,1	Нет	1000	3-5	Высокое
Смывы	a, d, e, f	Желто-коричневая	0,2	Лунка	0-0,1	Нет	1000	3-5	Высокое
Цитология (влажная фиксация)									
CSF(цереброспинальная жидкость)	b, e, f, g	Желто-коричневая	0,2	Туннель	Нет	0,05	750	3-5	Низкое
Моча	a, d, e, f, g	Желто-коричневая	0,2	Туннель	Нет	0,05	750	3-5	Высокое
Синовиальный	b, c, d, e, f, g	Белая	0,2	Туннель	Нет	0,05	750	3-5	Высокое
Мокрота	b, c, e, f, g	Белая	0,2	Туннель	Нет	0,05	750	3-5	Высокое
Жидкости из полости	a, b, c, d, e, f, g	Желто-коричневая	0,2	Туннель	Нет	0,05	750	3-5	Высокое
Смывы	a, b, d, e, f, g	Желто-коричневая	0,2	Туннель	Нет	0,05	750	3-5	Высокое
Предварительно фиксированный	d, e, f, g	Желто-коричневая	0,2	Туннель	0-0,1	Нет	1000	4-6	Высокое

Легенда

Подготовка Образца

- a. Обработать образцы крови
 1. Собрать в антикоагулянте
 2. Лизировать эритроциты.
- b. Если обработка будет отсрочена, сохраните хрупкие клетки.
- c. Обработать вязкие образцы если необходимо.
- d. Удалить преципитаты или дебрис когда необходимо.
- e. Отрегулируйте счет клеток.
Крупные (эпителиальные) 8,000-12, 000 в 0.2 mL образца.
Средние (уротелиальные) 16,000-24, 000 в 0.2 мл образца
Мелкие (Лейкоциты) 50,000-125,000 в 0.2 мл образца
- f. Концентрировать низко клеточные образцы прецентрифугированием.
- g. Растворить высококлеточные образцы сбалансированным физраствором плюс 4 - 8 процентов бычий сывороточный альбумин (БСА)
- h. Регулировать окружающую среду клетки когда это необходимо.
- i. Используйте обработанные слайды, чтобы увеличить клеточную адгезию

Цитопрокладка - Жидкие образцы = медленная (желто-коричневая).
Густые образцы = быстрая (белая).
Объем Образца - (0.5 мл максимальный - полная жидкость)
Предварительное увлажнение – Добавить до 200 мкл, отбалансированный физраствор в туннель, (образец в лунку).
Фиксация In Situ - Загрузите до 200 мкл образца в туннель, от 50 до 100 мкл фиксатора в лунку образца.
Скорость - Высокая скорость для мелких клеток, низкая для крупных и/или хрупких клеток.
Время - Образцы с дебрисом, вязкостью или высокой клеточностью будут требовать продления времени пробега.
*1 капля дистиллированной воды равняется 20 - 40 мкл в зависимости от используемой пипетки. Другие жидкости могут не попадать в этот диапазон.
**Для образцов в сбалансированном физрастворе, удвойте время пробега для образцов с БСА и нативных физиологических жидкостей.

Раздел 2

ОБЩИЕ ПРОЦЕДУРЫ

2.1 Подготовка Образцов

а. Подготовка Образцов Крови.

Если во время забора образца в нем обнаружится кровь, немедленно добавьте гепарин (10 единиц/мл образца) или этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) (1 мг/мл образца) или 3,8 процента цитрата натрия (0,1 мл/мл образца), чтобы предотвратить формирование сгустка'. Сгусток связывает клетки и уменьшает количество свободных клеток в образце. Это может также вызвать скопления, которые затемняют наблюдение в пределах используемой фракции образца.

Если образец содержит мало белых кровяных клеток и количество эритроцитов, не имеющее диагностической ценности, следует лизировать эритроциты перед обработкой. Добавьте 1 мл ледяной уксусной кислоты или 0.1 N HCL на 50 мл образца². Когда раствор станет коричневым, центрифугируйте образец в течение 10 минут при 600 g³. Промойте осадок клеток дважды, и ресуспендируйте в сбалансированном физрастворе, содержащем от 4 до 8% бычьего сывороточного альбумина (БСА).

ПРИМЕЧАНИЕ: _____

Эти лизирующие растворы являются фиксаторами, которые влияют на клеточную морфологию. Могут быть использованы и другие лизирующие процедуры^{2,3} Некоторые спиртовые фиксаторы также имеют лизирующую способность.

б. Сохранение Хрупких Клеток

Все образцы, не обрабатываемые немедленно, следует охладить. Образцы, которые должны быть окрашены по Папаниколау, могут быть сохранены добавлением равного объема фиксатора типа saccotanno. Моча обычно фиксируется этим методом, если обработка образца будет отсрочена больше чем на четыре часа. Также см. Раздел f.

с. Обработка Вязких Образцов

Образцы, содержащие высокие уровни белка, гиалуроновой кислоты, слизи или других полимерных материалов являются густыми и вязкими. Такие субстанции значительно удлиняют время абсорбции жидкости и могут даже остановить ее. Удлинение абсорбции жидкости способствует выживанию клетки. Для вязких образцов с высокой клеточной популяцией уменьшите вязкость, растворяя образец сбалансированным физраствором. Обработайте синовиальные жидкости ферментом гиалуронидазой (приблизительно 150 ME/2мл образца), чтобы гидролизировать присутствующую гиалуроновую кислоту.

Инкубируйте при 37 °C приблизительно в течение 1 часа.⁴ Синовиальные жидкости могут также быть разбавлены сбалансированным физраствором.

Образцы, которые должны быть предварительно сконцентрированы обычным центрифугированием (600 g в течение 10 минут) обрабатывают, отбрасывая вязкий супернатант и ресуспендируя в сбалансированном физрастворе, содержащем БСА. Образцы наполненные слизью могут быть смешаны с равными объемами фиксаторами типа Mucolox, или Saccotanno (выдержите 30 минут и тщательно перемешайте), но это затрудняет фиксирование клеток до цитоцентрифугирования. Фиксация закрепляет клетки, чтобы они не мигрировали вдоль слайда. Она также коагулирует слизь и белки, что уменьшает их способность связывать клетки на слайде микроскопа. Это способствует потере клеток в течение фиксации и окрашивания.

Чтобы минимизировать потерю клеток, используйте слайды, покрытые поли-L-лизином (SS 118) или аminosиланом (SS 119) и рекомендованную концентрацию клеток и объем образца (см. карту в Руководстве Пользователя Cytopro).

д. Удалить Дебрис и Преципитаты.

Некоторые образцы содержат дебрис или другие преципитаты, которые затемняют клетки в цитоцентрифугированном препарате и замедляют или останавливают поток жидкости в Cytograd. Предпочтительный метод разделения состоит в том, чтобы собрать клетки центрифугированием при 600 g в течение 10 минут. Отбросьте супернатант и ресуспендируйте клетки, собранные в

осадке, сбалансированным физраствором или в среде для культуры ткани.⁵ Повторите центрифугирование, если необходимо. Убедитесь, что включили от 4 до 8 процентов БСА в суспензионную жидкость.

ПРИМЕЧАНИЕ:

Не помещайте фрагменты ткани в Cytopro. Если желаете, отделите их для гистологической обработки. Удалите сгустки, соединительную ткань или гели где возможно, наматывая на стержень или на деревянную палочку. Мягко выдавите жидкость, если возможно, чтобы минимизировать потерю клеток в материале. Соли фосфатов преципитируют из образцов мочи при стоянии, особенно при охлаждении. Этот преципитат, может быть повторно растворен нагреванием мочи до 20 - 35 °С с осторожным размешиванием. Эти соли также будут растворены при добавлении нескольких капель уксусной кислоты; однако предпочтительно нагревание, поскольку уксусная кислота является фиксатором.

е. Регуляция Концентрации Клеток

Добавление надлежащего количества клеток в камеру - важный шаг в подготовке образца. Слишком много клеток вызывают уплотнение и перекрывание. Слишком мало клеток приводят к слайду малой ценности. В то время как опытный оператор может часто визуально оценивать клеточность образца, подсчет клеток является лучшим для оптимальных результатов. Число клеток, желательных в образце определяется размером клеток и размером области показа. Информация для 7мм области Cytopro показана ниже.

КАРТА ЗАГРУЗКИ КЛЕТОК

Клетка	Диаметр клетки	Рекомендуемое # клеток	Максимум для монослоя
Большая (Эпителиальная)	40-50мкм	8, 000-12, 000	16, 000
Средняя (Переходная Парабазальная)	20-40мкм	16, 000-24, 000	25, 000
Маленькая (Нейтрофил)	9-15 мкм	50,000-125,000	170, 000

Счет клеток может быть получен с помощью электронных счетчиков, или просто выполнен вручную в гемоцитометре (См. Рисунок 1) или в счетной системе уринализа типа Decislide ® (Fisher Scientific) или Count-10™ (Baxter). Клетки могут быть прижизненно окрашены (5 мкл Вескоровского реагента кристаллического фиолетового красителя Грамма [SS-041C] на 30 мкл образца) или могут наблюдаться световой рефракцией с конденсатором и источником света, повернутым вниз. Чтобы отрегулировать число клеток в образце:

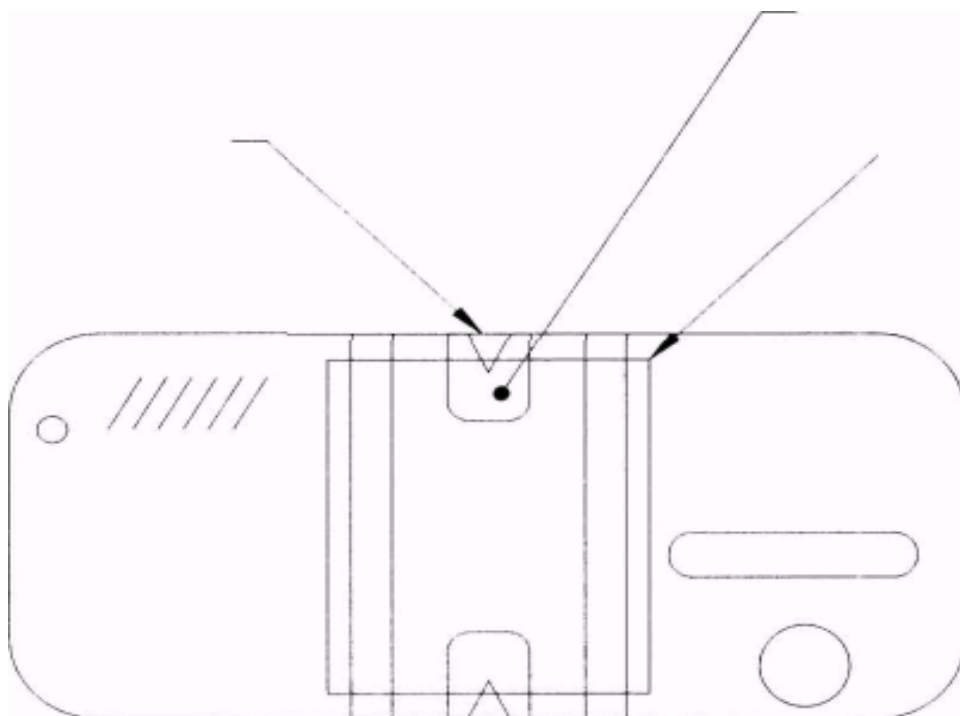
1. Определите концентрацию клеток в образце с помощью гемоцитометра или другим подходящим методом. Так как стандартная глубина камеры гемоцитометра равна 0.1 мм, то число клеток в 1 квадратном миллиметре, умноженное на 10 равняется количеству клеток в микролитре. Концентрация клеток в первоначальном образце получена, регулированием для любых разбавлений в процессе следующим образом:

Клетки на мкл = счет на мм² x 10 мм² /мкл x объем образца после разбавления /объем образца до разбавления

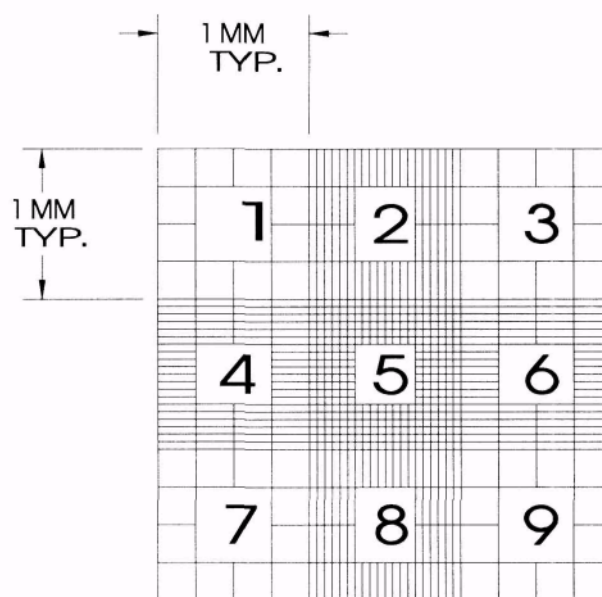
ДОБАВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА

ПЛАТФОРМА ОБРАЗЦА (.0,1 мм глубиной) СО
СЧЕТНОЙ СЕТКОЙ

ПОКРЫТИЕ



ГЕМОЦИТОМЕТР НЕЙБАУЭРА



МАСШТАБ: x20

Рисунок 1. ОБРАЗЕЦ СЧЕТНОЙ СЕТКИ ДЛЯ РАЗЛИНОВАННОГО ГЕМОЦИТОМЕТРА НЕЙБАУЭРА.

Например: при использовании прижизненно окрашенного препарата как рекомендовано выше, со счетом гемоцитометра 300 частей на квадратный миллиметр, концентрация образца равна:

$$\text{Клетки/мкл} = 300/\text{мм}^2 \times 10 \text{ мм}^2 / \text{мкл} \times \frac{35 \text{ мкл}}{30 \text{ мкл}} = 3,500/\text{мкл}$$

2. Определить желаемую концентрацию образца, чтобы достичь рекомендованного количества всех клеток в образце.

Пример: желаемый объем цитоцентрифуги = 200 мкл
 Желаемые общие лимфоциты = 100, 000 клеток
 Желаемая концентрация = $\frac{100,000}{200 \text{ мкл}}$ клеток = 500 клеток/мкл

3. Отрегулировать образец, чтобы дать желаемую концентрацию клеток.

Пример: Желаемая концентрация = 500 клеток/мкл
 Концентрация образца = 3500 клеток/мкл
 Объем образца = 200 мкл,

следовательно:

$$\left(\begin{array}{l} \text{Концентрация} \\ \text{суспензии клеток} \\ (3500 \text{ клеток /мкл}) \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{l} \text{Требуемый объем} \\ \text{неизвестный} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{l} \text{Объем образца} \\ \text{Cytopro (200 мкл)} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{l} \text{Желаемая} \\ \text{концентрация} \\ (500 \text{ клеток/мкл}) \end{array} \right)$$

$$\text{требуемый объем} = \frac{200 \text{ мкл} \times 500 \text{ клеток/мкл}}{3500 \text{ клеток/мкл}} = 28,6 \text{ мкл}$$

Используйте 20 - 25 мкл концентрированной суспензии клеток и разбавьте приблизительно в 200 мкл. Поскольку диапазон пригодный для подсчета широк, разбавление может быть не очень точным.

В качестве альтернативного подхода, используйте приведенную ниже таблицу разбавления, чтобы установить концентрацию клеток для объема образца Cytopro 200 мкл.

КАРТА РАЗБАВЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОСТИ

КЛЕТКА	СЧЕТ КЛЕТОК		РАЗБАВЛЕНИЕ		ОБЪЕМ ОБРАЗЦА	
	клетки/мм ²	ГЕМОЦИТОМЕТР Клетки/40хполей (среднее 5 полей)	DECISLIDE ®	КЛЕТКИ	РАЗБАВИТЕЛЬ	
Большая	6	2	никаких разбавлений			200мкл
	30	10	1мл	5мл		200мкл
	40-50мкм ^x	60	1мл	10мл		200мкл
Средняя	180	60	1мл	30мл		200мкл
	10	4	никаких разбавлений			200мкл
	60	20	1мл	5мл		200мкл
20-40мкм ^{xx}	120	40	1мл	10мл		200мкл
	360	120	1мл	30мл		200мкл
	Маленькая	60	20	никаких разбавлений		
9-15мкм ^{xxx}	300	100	1мл	5мл		200мкл
	600	200	1мл	10мл		200мкл
	1800	600	1мл	30мл		200мкл

x Эпителиальная

xx Переходная, некоторые гистиоциты и мезотелиальные

xxx Нейтрофилы, Лимфоциты, Клетки Плазмы

Чтобы использовать эту карту, не подсчитывайте концентрацию клеток. Просто определите счет на мм² в гемоцитометре или средний счет в пяти 40х полях микроскопа с камерой подсчета мочи. Используйте рекомендованное соотношение клеток и разбавителя, чтобы регулировать концентрацию образца для соответствующего размера клеток.

Если образец менее сконцентрирован чем указано, сконцентрируйте клетки обычным центрифугированием при 600g в течение 10 минут.

Сила g (RCF) рассчитывается следующим образом:

$$RCF = 1.12r \frac{(RPM)^2}{1000}$$

Где r (радиус) - расстояние в миллиметрах от центра ротора до основания пробирки образца во время центрифугирования.

Ресуспендируйте осадок в маленьком объеме его родной жидкости или подходящего разбавителя, приблизительно равном объему уплотненных клеток. Мягко, но тщательно ресуспендируйте клетки. Выполните подсчет клеток и разбавьте согласно вышеупомянутым рекомендациям.

f. Защита Клеточной Окружающей среды

Деградация клеток приводит к бедной морфологии при цитоцентрифугировании. Как только клетки удалены от пациента, они немедленно начинают деградировать в неблагоприятной окружающей среде *in vitro*. Не задерживайте обработку дольше чем на 4 часа.

Негативное влияние окружающей среды:

- осмотический шок
- низкое содержание кислорода
- низкое содержание питательных веществ
- низкое содержание белка
- накопление токсичных метаболических продуктов
- микробное загрязнение

Различные образцы показывают различные уровни стресса. Моча может быть стрессовой для некоторых клеток, и деградация может начаться до извлечения из тела. С другой стороны, плевральная жидкость может поддерживать клетки в хорошем состоянии в течение нескольких дней.

Следующие шаги полезны для уменьшения деградации клеток:

1. Охлаждение

Во всех образцах охлаждение (4°C) замедляет бактериальный рост и деградацию клеток и продлевает полезный срок образца. Все образцы должны быть охлаждены, если они не обработаны немедленно. Дайте образцам нагреться до комнатной температуры перед цитоцентрифугированием, чтобы увеличить адгезию клеток к слайдам и повторно растворите преципитаты, которые могут сформироваться во время охлаждения (особенно в моче).

2. Добавление Белка

Суспензии клеток стабилизируются в присутствии белка. Добавьте от 4 до 8 процентов конечной концентрации человеческого или бычьего сывороточного альбумина к образцам с низким содержанием белка, например, цереброспинальная жидкость (CSF), моча, и смывы.

3. Регулировка осмоляльности

Растворы с низкой или высокой осмоляльностью (такие как некоторые образцы мочи) могут быть очень вредны для клеток.

Они должны быть обработаны немедленно или сохранены добавлением равного объема 50-процентного спирта (этанол). Клетки, собранные центрифугированием должны быть ресуспендированы в сбалансированном физрастворе с БСА или в других подходящих разбавителях.

4. Добавление Питательных веществ

Несмотря на то, что нормальный физраствор (0.85 процентов NaCl) имеет соответствующую осмоляльность, он не является хорошей окружающей средой для клеток. Клетки показывают быстрые дегенеративные изменения в нормальном физрастворе.⁷ Не используйте его для ресуспендирования или разбавления клеток. Для лучших результатов, применяйте

сбалансированный физраствор или среду для культуры ткани, содержащую от 4 до 8 процентов БСА. Эти растворы содержат дополнительные питательные вещества, которые помогают поддерживать жизнеспособность клеток. Другие рекомендованные коммерчески доступные разбавители: ®, Plasma-Lyte®, PolysaP, Polyonic R-148®, Tisu-u-sol®, или Normosol, ® и среда для культуры ткани (Earles 199).

g. Использование Обработанных Слайдов

Клетки суспендированные в алкогольных консервантах теряют часть своей способности сцепляться со слайдом микроскопа. Это обычно клетки влажной фиксации для цитологического анализа. Процессы влажной фиксации и окрашивания делают клетки более уязвимыми для вымывания по сравнению с образцами, высушенными на воздухе. Используйте слайды, покрытые поли-л-лизином, аминосиланом, парлодием или желатином, чтобы помочь закрепить клетки и уменьшить их потерю. Кроме того, предварительно фиксированные образцы должны быть обработаны в условиях, которые обеспечивают абсорбцию жидкости (более высокая скорость и/или более длительное время). Затем слайды должны быть фиксированы опрыскиванием раствора, содержащим 2 процента Carbowax (полиэтилен гликоль или ПЭГ) и высушены на воздухе, чтобы увеличить адгезию клеток к слайду.

Чтобы подготовить слайды, покрытые поли-л-лизином, окуните предварительно очищенные слайды на 5 минут в свежий 0,1 процентный водный раствор поли-л-лизина. В конце оставьте слайды на воздухе для высыхания. Используйте слайды в течение двух недель.

Wescor предоставляет слайды предварительно покрытые поли-л-лизином (SS- 118), и аминосиланом (SS- 119).

2.2 Выбор Cytopad

Время абсорбции для желто-коричневого Cytopad примерно в два раза длиннее, чем для белого Cytopad с той же самой жидкостью. Желто-коричневый Cytopad должен быть использован, чтобы максимизировать восстановление клеток в слабо наполненных и водянистых жидкостях, особенно где популяция клеток низкая, как в цереброспинальной жидкости. Он также уменьшает высушивание воздухом и разрушение клеток, вызванное быстрыми потоками жидкости. Это происходит, когда клетки центрифугируют в отсутствие жидкости в течение длительных периодов времени.

Белый Cytopad разработан для густых жидкостей, которые текут слишком медленно с желто-коричневой подушечкой. Некоторые очень вязкие образцы, такие как слюна или синовиальная жидкость могут течь слишком медленно даже с белой подушечкой. Размещение одной или двух дополнительных подушечек в рамку до пробеге (см. руководство ротора для инструкций по сборке) заметно ускорит абсорбцию жидкости. Имейте в виду, что ускорение времени абсорбции жидкости до значения меньше чем 2 - 3 минуты может уменьшить восстановление клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ:

Быстрое авление Cytopad на влажную поверхность более чем 25 - 30 процентов позволяет сжатому кольцу контрроля потака расширяться. Это уменьшает время абсорбции жидкости и на целых 50 процентов. Экспонированные подушечки остаются годными к употреблению, но покажут несколько уменьшенное восстановление клеток. Для оптимального использования в областях высокой влажности, держите Cytopad запечатанными в полиэтиленовом пакете или предпочтительно в десикаторе перед использованием.

2.3 Объем Образца

Популярной практикой в цитоцентрифугировании является регулирование количества клеток, добавлением различных объемов образца. Иногда используется единственная капля (25 - 50 мкл). Использование малого объема образца уменьшает восстановление клеток и может дать неравное распределение клеток в пределах области показа. Начальный контакт образца с Cytograd при запуске происходит при очень низкой центробежной силе (100 - 300 ОБОРОТОВ В МИНУТУ); поэтому этот начальный захват жидкости сухим Cytograd не сопровождается осаждением клеток на слайд. В результате суспендированные клетки в жидкости теряются в подушечке. При очень маленьких объемах образца, это значительные потери. Для лучших результатов отрегулируйте концентрацию клеток (см. Секцию 2.1e), и используйте 200 - 300 мкл образца (или образец плюс жидкость предварительного увлажнения). Не добавляйте более 0.5мл (все добавления), так как избыток убежит из вершины камеры во время цитоцентрифугирования, если колпачок не находится на месте.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ!

Даже с колпачками на месте, избыток жидкости более 0.5 мл может просочиться через вентиляционные отверстия.

Кроме того, Cytograd имеет вместимость 0.5мл, и поток в подушечку будет замедлен или остановлен, если абсорбировано более 0.5 мл. Оптимальное восстановление клеток происходит с объемами образцов от 0.2 до 0.3 мл.

2.4 Варианты Загрузки образца

Cytopro камера разработана для того, чтобы обеспечить дополнительную гибкость обработки образца. Она содержит два порта добавления образца. Большой порт образца ведет в шахту образца. Маленький порт загружает туннель камеры. Карта вариантов загрузки образца, показанная ниже, поможет Вам выбрать эти варианты.

ВАРИАНТЫ ЗАГРУЗКИ ОБРАЗЦА

	БЕЗ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО УВЛАЖНЕНИЯ	С ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫМ УВЛАЖНЕНИЕМ	С ФИКСАТОРОМ В ШАХТЕ
ОБРАЗЕЦ В ШАХТЕ	Обычно используется для образцов с высокой клеточностью, вязких или наполненных дебрисом образцов. Используйте быстрый (белый) Cytograd. Объем образца 0,5 мл максимум.	Используйте для образцов с низкой клеточностью и малых объемов образца. Используйте медленный (желто-коричневый) Cytograd для увеличения восстановления. Максимум 0,2 мл жидкости в туннеле. *	<u>НЕ</u> рекомендуется смешивать фиксатор с образцом. Используйте только когда образец получен в фиксаторе.
ОБРАЗЕЦ В ТУННЕЛЕ	Обычно используется для образцов с высокой клеточностью, содержащих хрупкие клетки**, или большие или «сгруппированные» клетки, которые показывают неравное распределение, если помещены в шахту.	Не рекомендуется. Если туннель влажный когда добавляется образец, то образец направляет поток вперед в Cytograd или назад в шахту.	Для in situ фиксации образцов, окрашенных по Папаниколау. Это уменьшает артефакты высушивания на воздухе. Также требуется последующая фиксация.

* Оптимальный объем образца плюс предварительное увлажнение -от 0.2 мл до 0.3 мл.

** Загрузка образцов туннель обеспечивает более мягкую обработку чем загрузка в шахту. Практически, заметно небольшое различие.

2.5 Предварительное увлажнение

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ УВЛАЖНЕНИЕ

Потеря клеток в Cytorad может быть уменьшена добавлением до 200 мкл жидкости для предварительного увлажнения (сбалансированный физраствор) в туннельный порт с образцом в шахте. При запуске, жидкость для предварительного увлажнения течет вперед и контактирует с Cytorad, формируя жидкий барьер между Cytorad и образцом. Образец тогда входит в туннель и смешивается с жидкостью для предварительного увлажнения. Это предотвращает потерю клеток при начальном контакте с Cytorad во время ускорения и расширяет объем образца для лучшей абсорбции. Эта процедура рекомендуется для маленьких объемов образца и образцов, которые текут быстро и/или имеют немного клеток.

2.6 Фиксация *IN SITU*

ФИКСАЦИЯ *IN SITU*

Высушивание на воздухе образцов цитоцентрифугирования перед влажной фиксацией - проблема в цитологии. Это вызвано слишком долгим центрифугированием после того как абсорбция жидкости завершена и/или слишком большим испарением жидкости в промежутке между разборкой камеры и применением фиксирующего раствора. Хорошее решение этой проблемы – фиксация *in situ*.

Процедура:

1. Поместите образец (до 200 мкл) в туннель камеры через туннельный порт.
2. Поместите 50 мкл фиксатора Saccotanno-типа или другого фиксатора в шахту образца.
3. Выполняйте, как описано в карте процедур. Убедитесь, что жидкость образца в туннеле не течет вперед в Cytorad до запуска. Избегайте столкновения или наклона ротора во время транспортировки.
4. Выполняйте достаточно долго, чтобы гарантировать полную абсорбцию жидкости для надлежащего уплотнения клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ:

Перед добавлением образца убедитесь, что камера сухая.

После запуска образец течет сначала вперед. Фиксатор имеет тенденцию "плавать" позади образца с небольшим смешиванием из-за его более низкой плотности. Как только клетки собраны на слайде, фиксатор контактирует с клетками и фиксирует их на месте. Для полной фиксации этого не достаточно. Немедленно дополнительно фиксируйте все *in situ*-фиксированные образцы в течение 5 минут в 95-процентном этаноле или в другом подходящем фиксирующем растворе. Эта процедура - превосходный метод предотвратить высушивание воздухом в цитологических образцах.

2.7 Выбор Скорост и

Скорость ротора является основным фактором относительной центробежной силы ($RCF = 109.8$ (оборотов в минуту/1000)² в Cytopro 439 g при 2000 оборотов в минуту). Более высокие скорости применяют большую силу и имеют тенденцию увеличивать восстановление клеток. Поскольку маленькие клетки, такие как бактерии, оседают намного медленнее, чем большие (эпителиальные) клетки, то выбор скорости зависит от используемых клеток и целей образца. Бактериальное восстановление должно быть оптимально при 2000 оборотов в минуту. В дополнение к

воздействию на восстановление, скорость ротора производит силы, которые вызывают искажение клеток. При увеличении скорости ротора, сила, воздействующая на клетки, увеличивается геометрически.

Чтобы минимизировать эти воздействия на большие клетки, используйте скорости от 500 до 1000 оборотов в минуту. Морфологическое искажение больше зависит от состояния клеток, чем от скорости. Свежие клетки в хорошем состоянии показывают незначительные эффекты от скорости, в то время как старые клетки подвергаются сильному воздействию и могут показать сильное искажение даже при низких скоростях.

Цитологические образцы иногда предварительно фиксируют, то есть фиксатор смешивают с суспензией клеток перед обработкой. Это сохраняет образцы от деградации клеток и микробного роста, но делает клетки твердыми и заставляет их сопротивляться разглаживанию и сцеплению со слайдом. Степень отвердевания зависит от концентрации алкоголя в образце и времени, которое клетки проводят в фиксаторе. Белок и слизь также преципитируют и коагулируют, таким образом, теряя свою способность связывать клетки на слайде.

Увеличьте скорость и время пробега, чтобы применить больше силы к клеткам в пропорции к твердости ячейки. Это увеличивает сглаживание и прилипание ячеек к слайду для лучшей морфологии и улучшенного восстановления.

2.8 Выбор Времени Пробега

Время цитоцентрифугирования должно быть установлено так, чтобы позволить полную абсорбцию жидкости суспензии, но необходимо минимизировать время пробега образца после завершения полной абсорбции жидкости. Обычно для этого требуется некоторый опыт в предсказании характеристик жидкости, которые воздействуют на времена абсорбции жидкости.

Сбалансированный физраствор Хэнкса показывает очень быстрые уровни потока. Он полезен для растворения образцов с высокой вязкостью, чтобы ускорить время их абсорбции. Среда Эрла 199 показывает время абсорбции от 1.5 до 2 раз больше по сравнению со сбалансированным физраствором. Добавление БСА также увеличивает время потока до двух раз при концентрации БСА от 4 до 8 процентов.

Нативные жидкости тела широко варьируют из-за присутствия белка, слизи, дебриса, клеток и других компонентов, которые будут влиять на время абсорбции жидкости. Длительность пробега, перечисленная в Общей Карте Процедур отражает образцы, которые ресуспендированы в сбалансированном физрастворе. Если добавлен БСА или используется нативная жидкость суспензии, то в качестве отправной точки рекомендуется двойное время пробега, упомянутое в списке. Если присутствует остаточная жидкость, то сделайте повторный пробег образца или следуйте инструкциям для того, чтобы избавиться от остаточной жидкости (см. Секцию 3.7 в руководстве Пользователя Суторго или Секцию 2.7 в руководстве Пользователя Суторго Ротора).

Время пробега имеет существенный эффект на клеточную морфологию. Как только плавучий эффект суспензионной жидкости потерян, клетки испытывают почти двадцатикратное увеличение приложенной силы. Пока жидкость остается, клетки не полностью разглаживаются против слайда. Как только жидкость абсорбирована, хрупкие клетки могут быть легко искажены или разрушены. Практически, идеал достигается только изредка из-за вариативности скоростей потока Cytograd и характеристик жидкости образца.

2.9 Выбор Ускорения

При 1000 оборотах в минуту Суторго ускоряется со следующими скоростями (в секундах):

Высокая: 2 - 4 секунды
Средняя: 3 - 6 секунд
Низкая: 10 - 14 секунд

В принципе, низкое ускорение должно использоваться для хрупких клеток. Практически, есть небольшое заметное различие. Используйте высокое ускорение, чтобы минимизировать потерю клеток при запуске, если только образец не является необычно хрупким.

СЕКЦИЯ 2
ОБЩИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Ссылки

Секция 2

1. C.E. Bates, G. R Durfee, *Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, Volume Two, Fourth Edition, L.G. Koss, ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA., pg. 1447.
2. C.E. Bates, G.R. Durfee, *Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, Pg. 1463.
3. C.M Keebler, *Comprehensive Cytopathology*, M. Bibbo, ed., W. B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanoich, Inc. Philadelphia, PA., pg. 898.
4. J.B. Henry, *Todd-Stanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Fifteenth Edition, I. Davidson, ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA., pg. 1266.
5. G.W. Gill, *The Shandon Cytospin 2 Manual, Techniques, Tips, and Troubleshooting*, Second Edition, Shandon Inc., Pittsburgh, PA., pg. 19.
6. B.A. Brown, *Hematology: Principles and Procedures*, Fourth Edition, Lea and Febiger, Philadelphia PA., pg.34-35.
7. C.M. Pomerat, R.R. Overman, *Electrolytes and Plasma Expanders-Reaction of human cells in perfusion chambers with phase contrast, time-lapse cine records*. Zellforsch 45:2-7, 1956.
8. Anon. Cytospin® 3 Cell Preparation System Operator Guide, Shandon Lipshaw, Pittsburgh, PA. p 21.

ПОИСК НЕИСПРАВНОСТЕЙ

ПРОБЛЕМА	ПРИЧИНА	МЕРЫ
Остаточная жидкость	Время пробега слишком короткое, образец слишком вязкий или дебрис в образце закупорил Cytograd	Сделайте повторный пробег образца или избавьтесь от жидкости (см. Секцию 2.7 в руководстве Ротора или 3.7 в Руководстве Пользователя 7620). Или используйте дополнительный Cytograd (см. Секцию 2.2).
Слишком мало клеток в области показа.	Слишком мало клеток добавлено в камеру.	Увеличьте концентрацию клеток. Считайте клетки как рекомендовано. Настройте на рекомендованный счет и объем. Смотрите Общую Карту Процедур.
	Потеря клеток из-за контакта образца с Cytograd, когда образец помещен в туннель до пробега.	Не кладите спиртовые растворы образца в туннель. Используйте чрезвычайную осторожность, чтобы избежать встряхивания или наклона ротора, когда образец находится в туннеле. Убедитесь, что камера сухая, и жидкость не течет вперед когда помещена в туннель.
	Потеря клеток из-за малого объема образца (высокая или низкая концентрация клеток)	Используйте 200-300 мкл образца. Если используете жидкость для предварительного увлажнения или фиксации in situ, то полный объем должен быть 200 - 300 мкл.
	Потеря клеток во время цитоцентрифугирования из-за короткого времени абсорбции жидкости	Используйте желто-коричневый Cytograd. Держите Cytograd и камеры закрытом полиэтиленовом пакете. Влажность более 30 процентов раздувает сжимающее кольцо Cytograd и уменьшает время абсорбции жидкости.
	Потеря клеток из-за предварительно фиксированных клеток, устойчивых против разглаживания и прилипания к	Используйте слайды, обработанные поли-лизинном или аминосиланом. Высушивайте на воздухе

поверхности слайда.

слайды после фиксации
опрыскиванием фиксатором типа
Saccomanno

Разгладьте клетки, увеличивая
время пробега, чтобы гарантировать
абсорбцию жидкости и/или
увеличьте скорость, чтобы
применить больше силы к клеткам.

Слишком мало клеток
в области показа
(продолжение)

Потеря клеток из-за неполной
абсорбции жидкости, клетки
менее разглажены и
следовательно, слабая
адгезия к слайду

Проверьте визуально
остаточную жидкость
и сделайте повторный
пробег, если она
присутствует.

Увеличьте время пробега.
Уменьшите объем образца до 200 -
300 мкл. Уменьшите вязкость
образца и дебрис, чтобы увеличить
уровень абсорбции жидкости. Если
образец влажной фиксации,
используйте аэрозольный фиксатор
вместо фиксации погружением, и
позвольте аэрозольному фиксатору
испариться (10 минут) перед
окрашиванием.

Потеря клеток из-за
того, что суспензия клеток
очень сконцентрирована
и осаждается многослойно
на слайде и, следовательно,
более чувствительно к
смещению во время
последующей обработки.

Отрегулируйте объем
образца и концентрацию
клеток до рекомендуемых
уровней. (См. Карту Общих
Процедур).

Потеря клеток из-за клеточного
материала, захваченного в
легко вытесняемых массах в
результате слизи или
коагуляции эритроцитов

Предотвратите образование
сгустка с помощью анти-
коагулянтов. Растворите
слизь (т.е., Mucloexh или
Saccomanno).

Слишком много клеток
в области показа.

Слишком много клеток в
образце.

Определите счет клеток
и используйте
рекомендованное количество клеток
в 0.2 - 0.3 мл образца.

Клетки искаженные,
поврежденные или
разорванные.

Чрезмерное время пробега
после абсорбции жидкости

Уменьшите время пробега.
Увеличьте объем образца до
200 – 300 мкл.

Чрезмерные скорости для
хрупких клеток.

Уменьшите скорость ротора.

Клетки искаженные,
поврежденные или
разорванные.

Хрупкие клетки. Образец
начавший деградировать
из-за продленного времени

Требуется свежий образец.
Для более хрупких клеток
укоротите время пробега

	между отбором и цитоцентрифугированием.	так, чтобы была остаточная жидкость. Осторожно удалите жидкость после пробега. Это может вызвать некоторую потерю клеток, но это самая мягкая процедура, доступная с Cytopro.
	Клетки ресуспендированы в нормальном физрастворе или другом неподходящем разбавителе в течение слишком долгого времени.	Добавьте БСА, чтобы стабилизировать клетки в среде с недостатком белка. Избегайте неподходящего разбавителя (нормальный физраствор).
Клетки не разглажены; или - маленькие, округленные или чересчур сильно окрашены.	Остаточная жидкость в конце пробега. Клетки разглаживаются только частично особенно при низких скоростях цитоцентрифугирования.	Увеличьте время пробега так, чтобы позволить полную абсорбцию жидкости. Используйте белый Cytograd для образцов, которые абсорбируются медленно.
	Клетки предварительно фиксированные до пробега. Затвердевшие клетки не в состоянии разгладиться против <u>слайда</u> .	Увеличьте скорость и время пробега.
Клетки высушены на воздухе	Излишнее время пробега после абсорбции жидкости.	Фиксация in situ (200 мкл образца загрузите в порт тоннеля, 50 мкл фиксатора в шахту) или уменьшите время пробега.
	Слайды экспонированы на просушку слишком долго после извлечения из ротора.	Фиксация in situ или фиксируйте слайды как можно быстрее и как можно ближе к ротору.
	Слишком короткое время абсорбции жидкости.	Сократите время пробега, используйте желто-коричневый Cytograd и добавьте 4-процента БСА.
Не представительная популяция клеток. (т.е. потеря тяжелых, больших клеток или селективная потеря маленьких легких клеток).	Селективная потеря клеток во время предварительной подготовки. Тяжелые клетки идут на дно осадка контейнера или осадка центрифугирования	Чтобы предотвратить потерю клеток во время обработки осторожно перемешайте перед забором образца из контейнера. Полностью ресуспендируйте все клетки осадка предварительного центрифугирования
Не представительные клетки и т.д. (продолжение).	Поток жидкости слишком быстрый. Маленькие легкие клетки селективно вымываются в Cytograd вместо оседания на слайд.	Используйте желто-коричневый Cytograd и 200-300 мкл образца. Защитите подушечки от влажности перед использованием.
Область размещения клеток заполнилась дебрисом.	Образец содержит дебрис. Экстрацеллюлярные белки или слизь коагулировали от фиксатора.	Удалите дебрис. Используйте не фиксированные клетки если возможно.
Область размещения клеток переполнена клетками, но содержит мало белых клеток.	Образец содержит избыток эритроцитов.	Лизируйте эритроциты и соберите белые клетки центрифугированием и ресуспендированием.

Клетки наблюдаются вне 7мм области образца.	Неабсорбированная жидкость в камере. Жидкость течет вниз когда камера извлекается, клетки текут с жидкостью.	Убедитесь что вся жидкость абсорбирована (см. выше). Удалите жидкость частично нажимая на рычаг и держатель на несколько секунд, пока жидкость не абсорбируется. Затем нажмите рычаг полностью, чтобы втянуть Sytopad и камеру.
	Неабсорбированная жидкость на слайде позволяет клеткам течь во время фиксации (фиксация опрыскиванием).	Убедитесь в полной абсорбции жидкости и используйте фиксацию <i>in situ</i> , чтобы избежать высушивания воздухом (см. выше).
	Держите слайд слишком близко к аэрозольному спрею во время фиксации.	Будьте осторожны при фиксации, чтобы минимизировать воздействия на образец, т.е. медленно окунайте и избегайте близкого опрыскивания.
Центр пятна содержит мало клеток. Клетки расположены только по краю области сбора.	Остаточная жидкость способствует вымыванию клеток во время фиксации	Фиксация <i>in situ</i> и убедитесь в абсорбции жидкости (см. выше).
	Объем клеточной суспензии очень мал.	Увеличьте объем образца до 200-300 мкл. Если образец высоко клеточный, увеличьте объем подходящим разбавителем. См. Секцию 2.
Клетки на задней стороне слайда.	Используемая камера и подушечка позволили коснуться к держателю камеры после удаления слайда.	Удалите камеру перед удалением слайда.