CYTOMICS ™ FC500

с программным обеспечением CXP



BECKMAN COULTER™

Содержание

Раздел 1 – Включение и выключение FC500 3
Раздел 2 – Создание протокола 20
Раздел 3 – Цветовая компенсация 31
Раздел 5 – Свойства диаграмм и регионов 42
Раздел 6 –Acquisition Manager (Управление сбором данных) 47
Раздел 7 – Создание панелей 49
Раздел 8 – Отчеты по панелям и база данных 53
Раздел 9 – Опция «Workspace Preferences» (установки рабочего пространства) 63
Раздел 10 – Контроль качества, графики Леви-Дженнингса и таблицы данных 69
Раздел 11 – Администраторские функции 78
Раздел 12 – Проблемы и неполадки при работе в программе CXP 81
Раздел 13 – Реагенты контроля качества 83
Раздел 14 – Моноклональные антитела, реагенты и устройства для пробоподготовки 85
Раздел 15 – Подсчет абсолютного количества клеток 88
Раздел 16 - Мастер автонастройки Autosetup II Wizard 92
Раздел 17 – Программное обеспечение CXP-Analysis 98
Приложение 1. Действия оператора при сообщениях об ошибках работы цитометра 108
Приложение 2. Иконки панели инструментов CXP 111
Приложение 3. Дисплей цитометра и сообщения об ошибках 113

Операции, которыми должен владеть каждый пользователь

Раздел 1 – Включение и выключение FC500

Введение

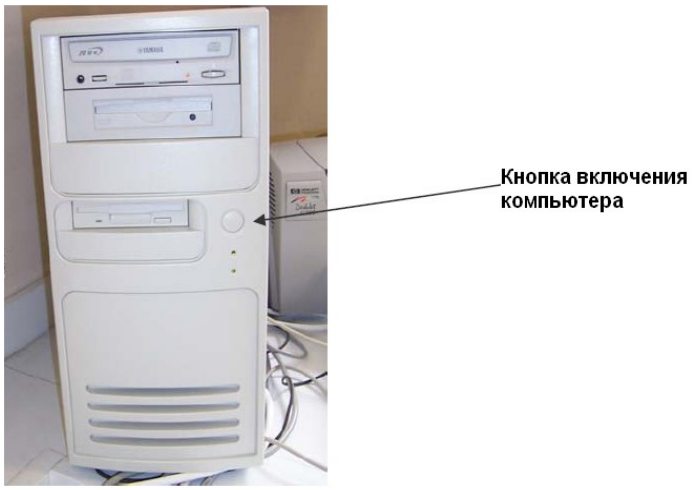
CXP – программное обеспечение, которое используется для сбора данных на проточном цитометре FC500. Эта программа разделена на 2 модуля – ***CXP Cytometer***, который используется для сбора данных и дает возможность просмотреть уже записанные файлы данных и модуль ***CXP Analysis***, который используется исключительно для воспроизведения предварительно сохраненных данных.

Необходимые материалы:

- Флуоросферы Coulter Flow Check
- Протокол QC 1L Flow Check™_ALIGN

Включение

- Нажмите кнопку ON на системном блоке компьютера.



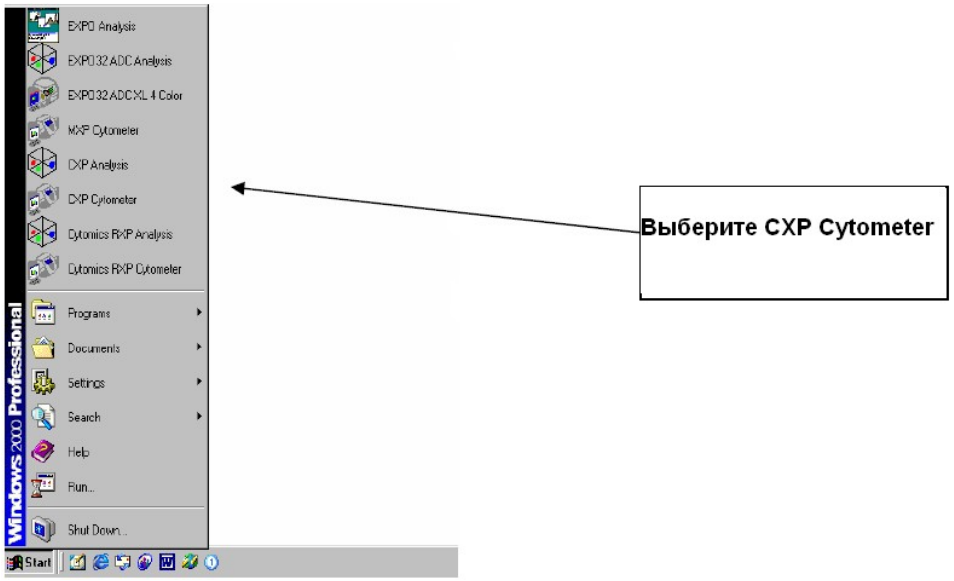
После загрузки компьютера Вы увидите на экране окно входа в Windows. Убедитесь, что в поле User Name написано Administrator. Если нет, но напишите. Убедитесь, что поле Password остается чистым и нажмите OK.



- После того как на экране появится рабочий стол Windows, найдите иконку CXP Cytometer и двойным щелчком левой кнопки мыши активируйте ее.

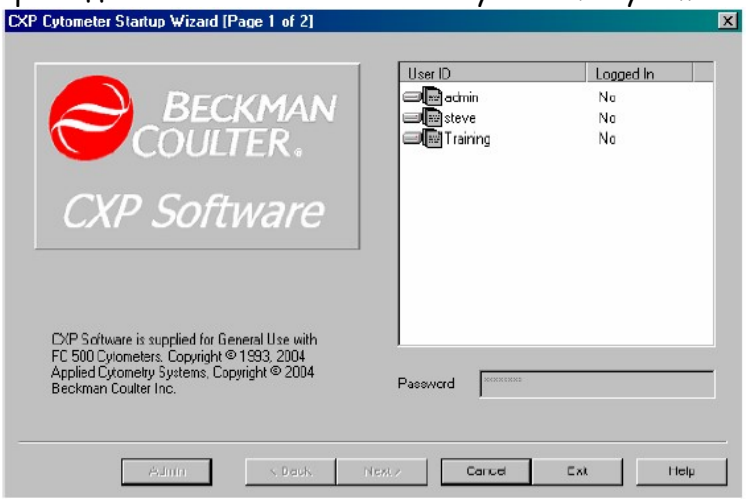


Если на рабочем столе иконки нет, нажмите кнопку START, выберите строку CXP Cytometer и щелкните левой кнопкой мыши. После этого включится цитометр и начнется процесс инициализации.

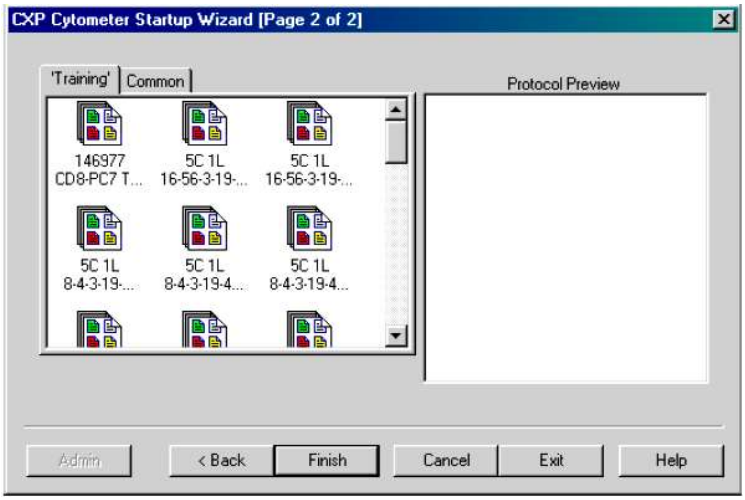


Вход в программное обеспечение

- На экране должно появиться окно запуска CXP Cytometer.

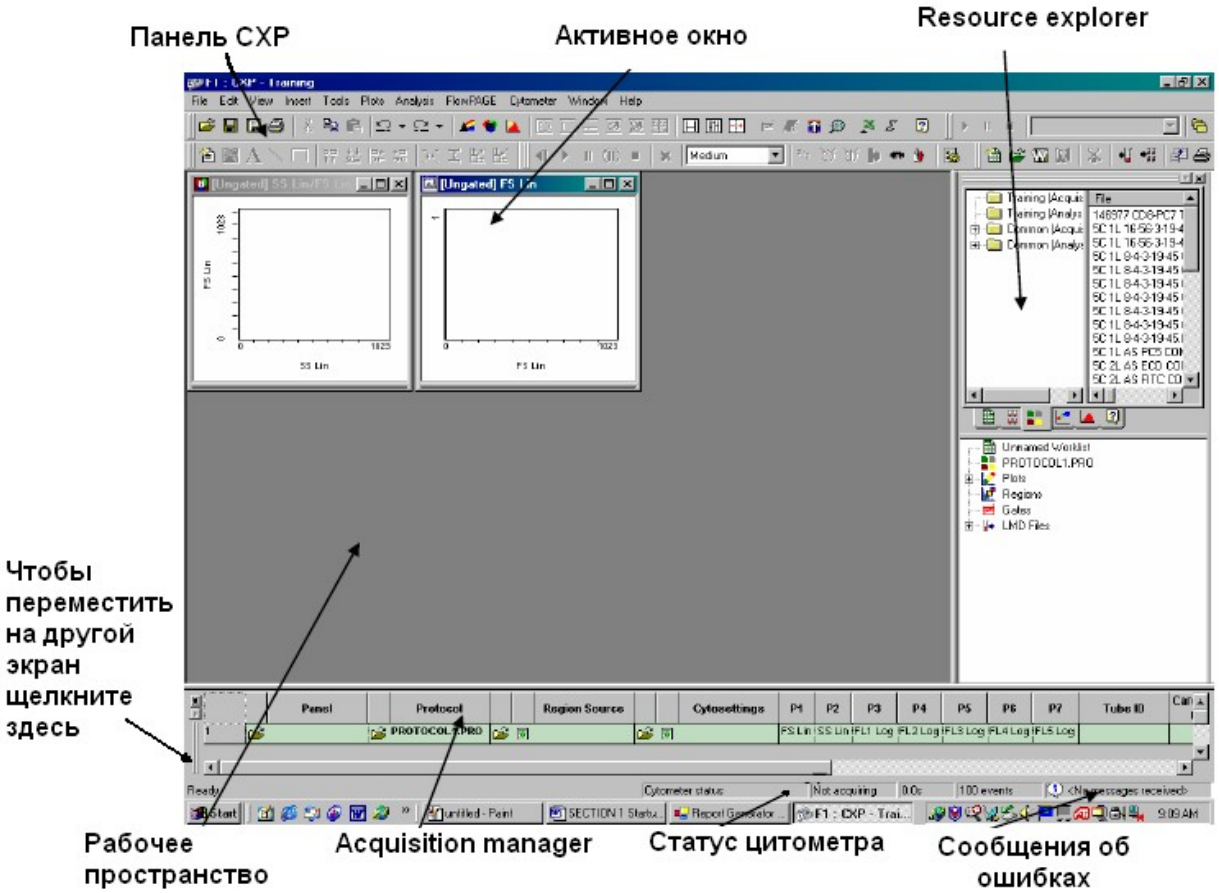


- Выберите Вашу папку, введите соответствующий пароль. Нажмите Next. Появится список протоколов из Вашей папки или из папки Common.



Если Вы знаете, какой протокол Вам нужен, выделите его и нажмите Finish. Если нет, то сразу нажмите Finish. Вы сможете выбрать нужный протокол позже, используя Resource Explorer.

- На экране должно появиться окно программного обеспечения CXP.



- Если Resource Explorer и/или Acquisition Manager не появились, выберите View в верхней строке меню и активируйте их щелчком мыши. Вы можете также переместить их на второй экран, чтобы освободить рабочее пространство на первом.
- Внизу справа на первом экране Вы увидите сообщения о статусе цитометра. При включении цитометра будет наблюдаться следующая последовательность сообщений:

Startup in Progress...

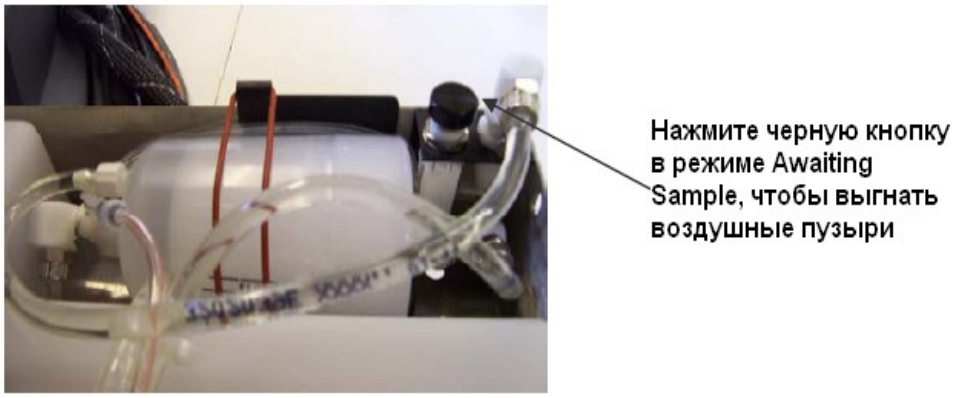
Verification
Run Initialization
Awaiting Sample

Пока цитометр прогревается и выходит в рабочий режим, есть время, чтобы выполнить следующие процедуры:

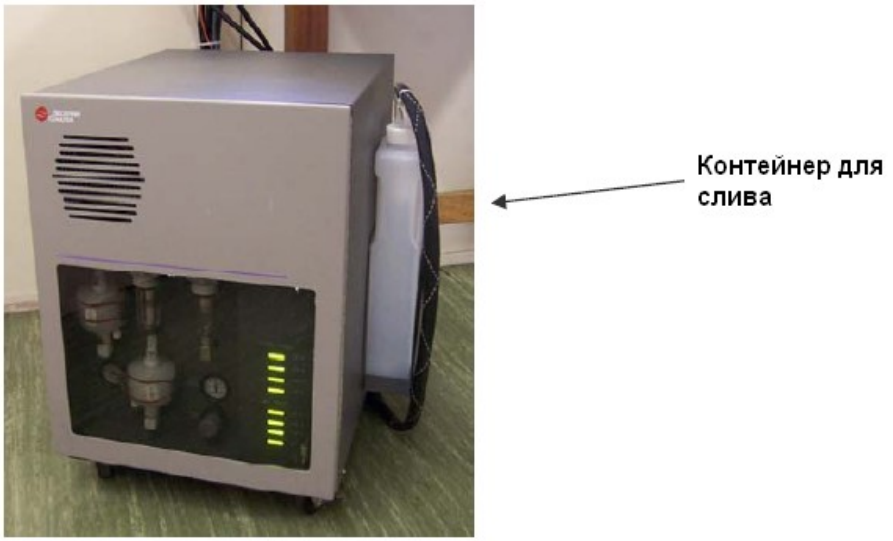
- Откройте крышку корпуса цитометра, потянув ее на себя, а затем вверх. Вытяните на себя подставку с контейнерами для жидкостей.
- Заполните, если требуется, резервуары реагентами IsoFlow™ или Coulter® CLEANZ. (Если Вы пролили какой-либо раствор на контейнер, не забудьте осушить это место, во избежание выпадения кристаллов солей).



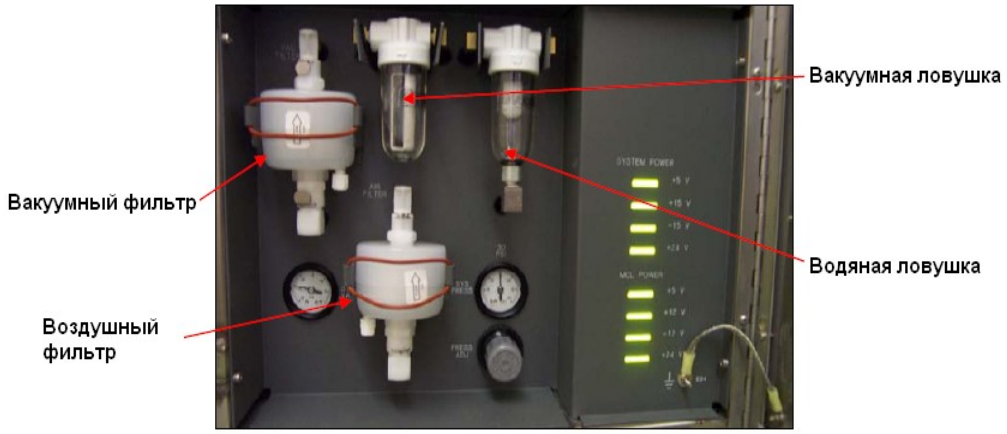
- Проверьте воздушный фильтр и убедитесь, что в нем нет крупных воздушных пузырей. Если пузыри присутствуют, задвиньте подставку с контейнерами на место, дождитесь, когда цитометр войдет в режим "Awaiting Sample" и нажмите черную кнопку рядом с фильтром на 10 секунд.



- Пока прибор прогревается и набирает давление можно освободить контейнер для слива, который находится на боковой стенке источника питания.



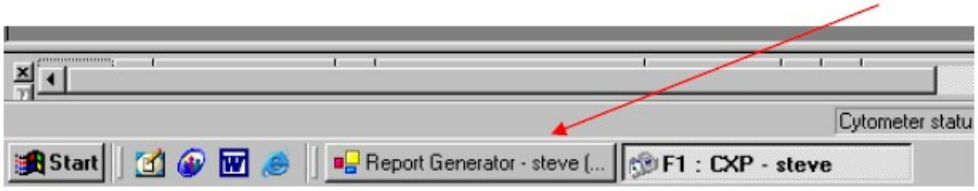
- Откройте дверь блока источника питания и удостоверьтесь, что в водяных ловушках нет жидкости, а в вакуумных фильтрах нет воздуха. Если водяные ловушки заполнены жидкостью менее чем на 1/3, их можно слить, предварительно выключив цитометр. Если уровень жидкости выше, следует обратиться в сервисную службу Beckman Coulter. Из воздушных и вакуумных фильтров также можно удалить жидкость через отверстия внизу фильтров.



- Проверьте давление на шкале манометра и убедитесь, что стрелка находится между 28 и 32 psi (pound on square inch - фунт на квадратный дюйм). Если стрелка отклоняется от нормы не более чем на 5 psi, Вы можете корректировать его с помощью серой ручки под шкалой манометра. Если давление отклоняется от нормы более чем на 5 psi, обратитесь с сервисную службу.
- Проверьте показания вакуумметра. Стрелка должна быть между 17 и 30 inches/Hg. Если значение вне этого интервала обратитесь в сервисную службу.



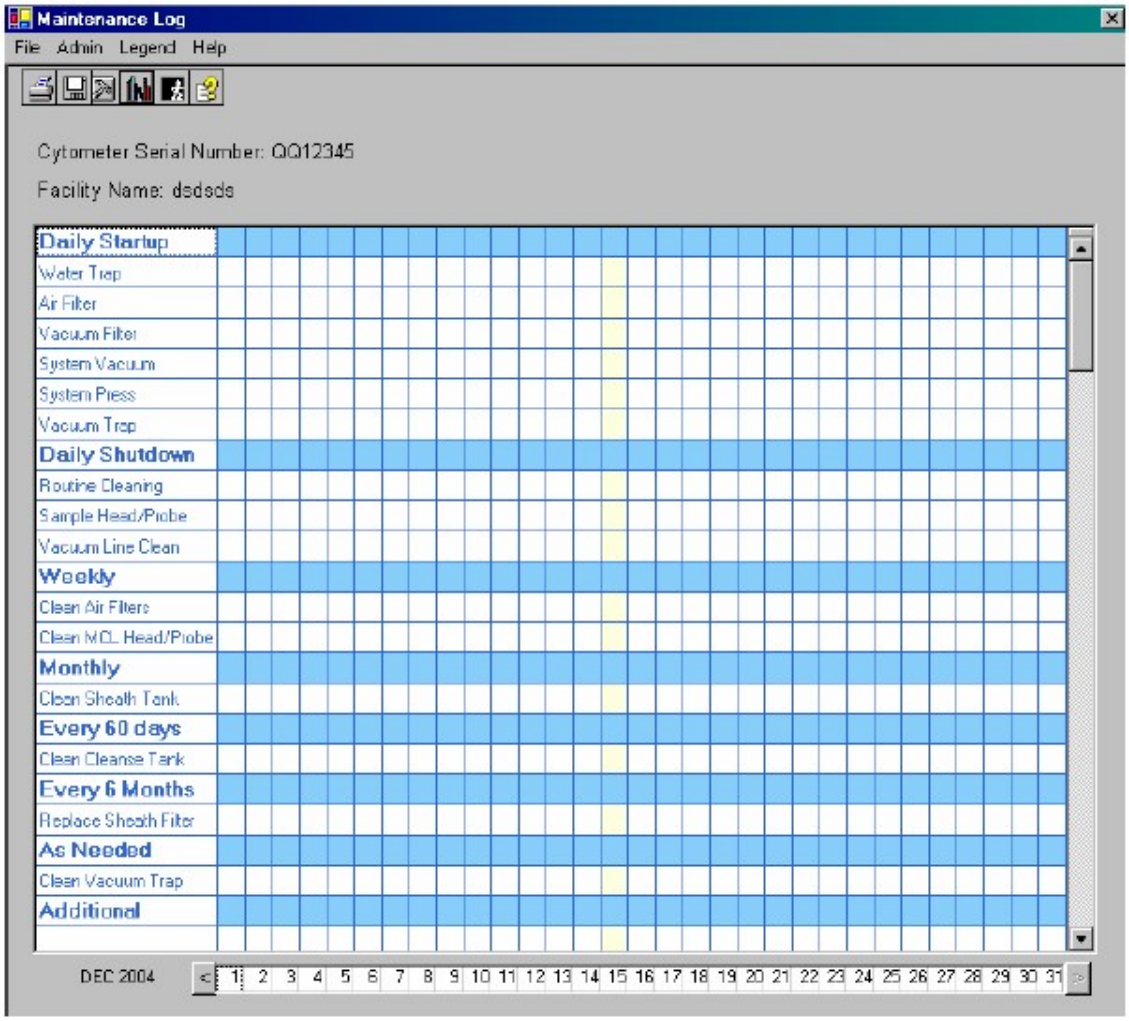
- После того как были выполнены все процедуры проверки, Вы можете заполнить Журнал ежедневной проверки (Maintenance log).
- Для этого щелкните мышью на Report Generator (эта кнопка обычно находится на экране левого монитора внизу).



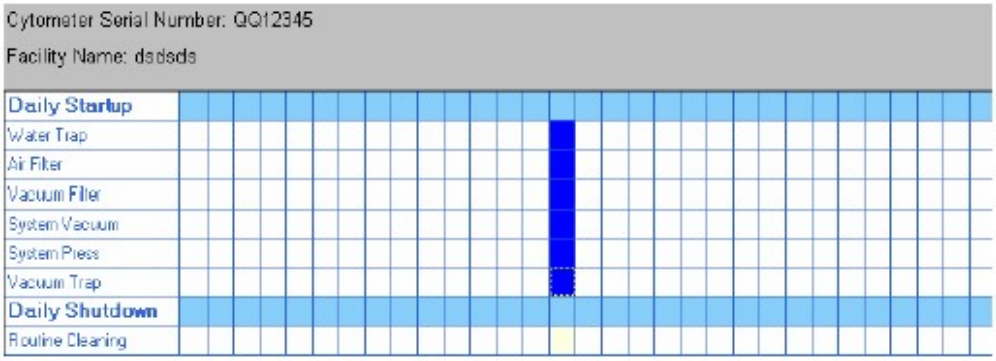
Выберите иконку Maintenance.



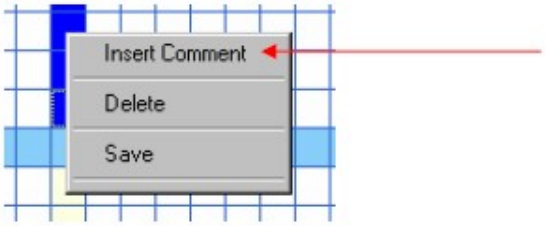
- Откроется экран Maintenance Log.



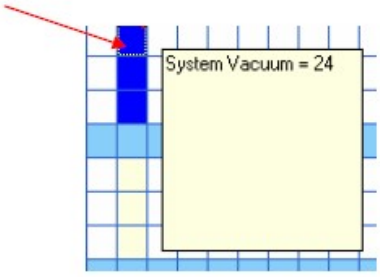
- В открывшейся таблице Вы можете делать отметки о рутинной проверке состояния прибора. Текущий день отмечен желтым цветом. Чтобы отметить состояние того или иного параметра нужно сделать двойной щелчок мышью на соответствующей клетке.



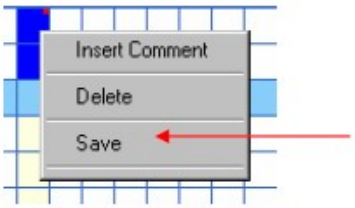
- Если Вы хотите добавить комментарии, щелкните правой кнопкой мыши на клетке и выберите Insert Comment.



- Добавьте комментарии в текстовую строку и щелкните левой кнопкой мыши. К правом верхнем углу клетки появится красная точка, которая указывает на то, что здесь содержится текст.



- Чтобы сохранить добавленный комментарий щелкните правой кнопкой мыши на клетке и выберите Save.

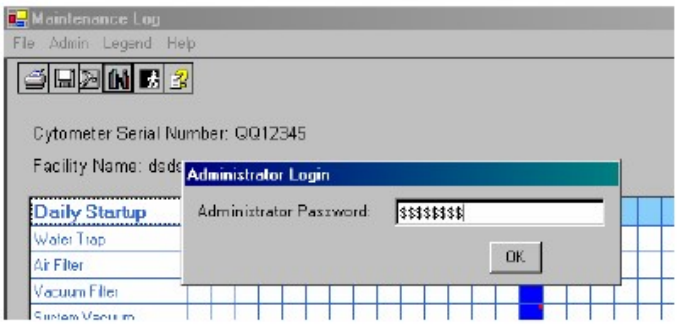


Попробуйте щелкнуть в незаштрихованных клетках, и Вы увидите, что у Вас нет доступа к этим областям. При входе в программу под паролем пользователя Вы не можете дополнять или изменять предыдущие данные. Чтобы получить расширенный доступ, нужно войти под паролем администратора.

- Для этого выберите Admin -> Administrator из меню экрана Maintenance Log.



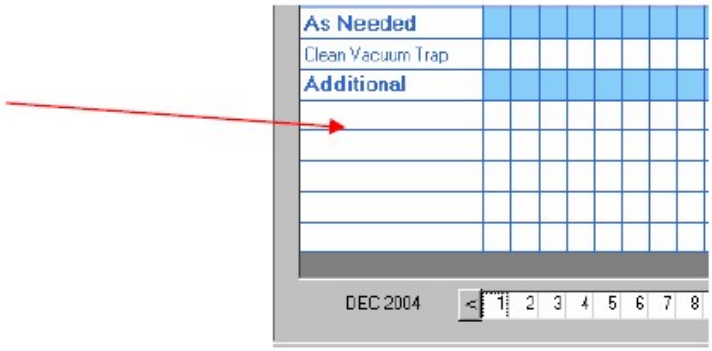
- Введите пароль администратора (password). Нажмите OK.



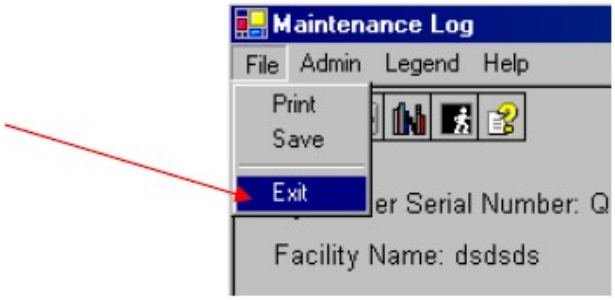
- Появится подтверждение входа под паролем администратора.



- Теперь Вы сможете корректировать введенные ранее комментарии.
- Также Вы можете добавлять новые параметры для проверки в графу со списком устройств.



- Когда Вы закончите работу в Maintenance Log, нажмите File -> Exit. Выберите YES, когда система спросит, сохранять ли изменения.



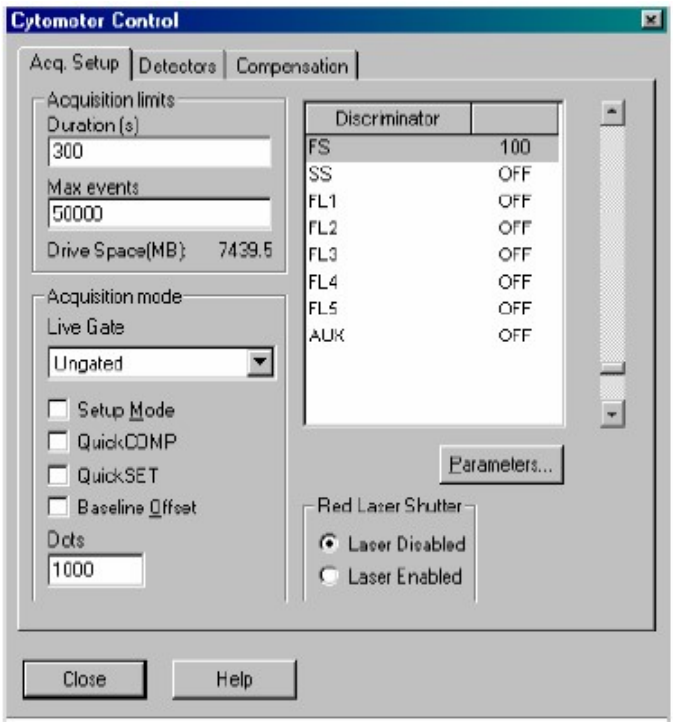
После проверки механической части цитометра нужно обратить внимание на подтверждение прибора о готовности к запуску образца, что говорит о том, что лазер (или лазеры) работают нормально.

Опция Cytometer Controls (Управление цитометром)

Эта опция дает возможность управлять цитометром, изменяя усиление на каналах, цветовую компенсацию, установку дискриминатора. Чтобы открыть окно Cytometer Controls выберите в верхней строке меню Cytometer -> Cytometer Controls или найдите иконку.

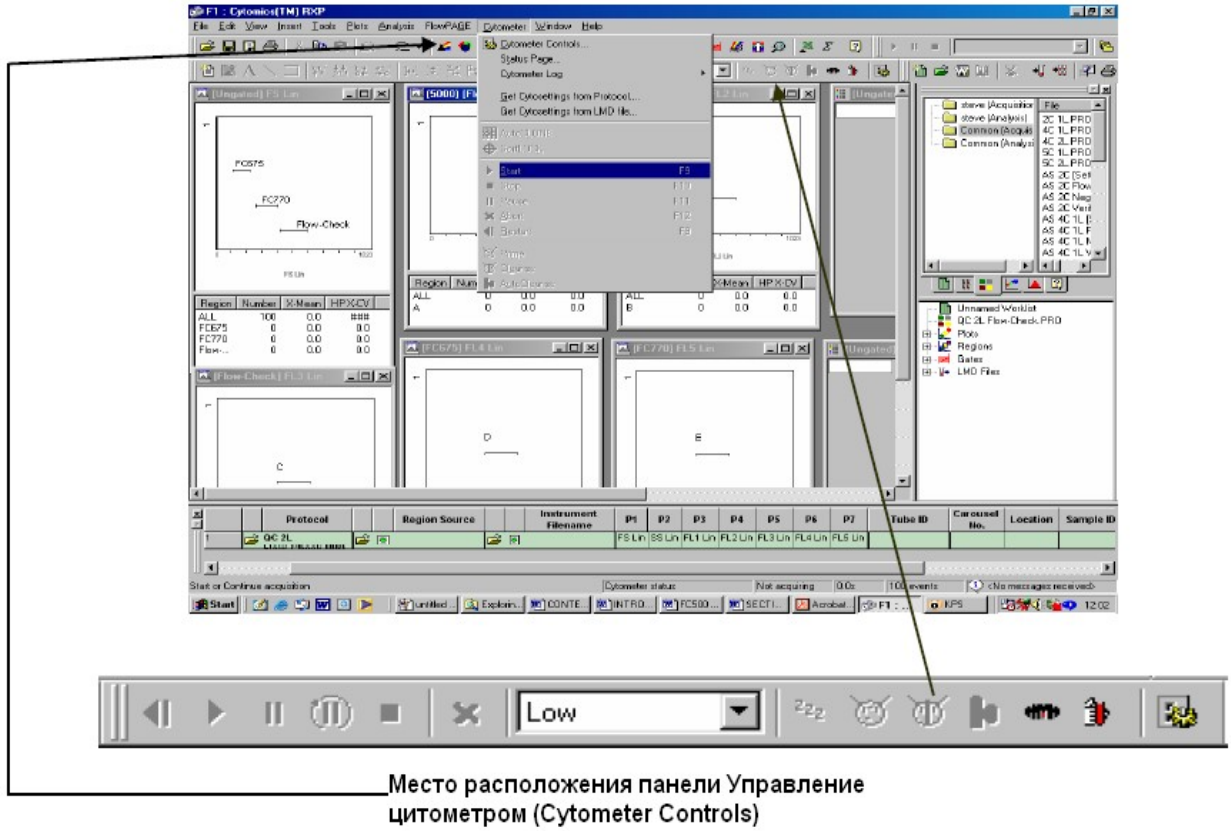


Окно Cytometer Controls Вы можете разместить как Вам удобно.



Управление забором проб (останов - Stop, пауза - Pause, прерывание анализа - Abort, повторный старт - Restart) можно осуществлять следующими способами:

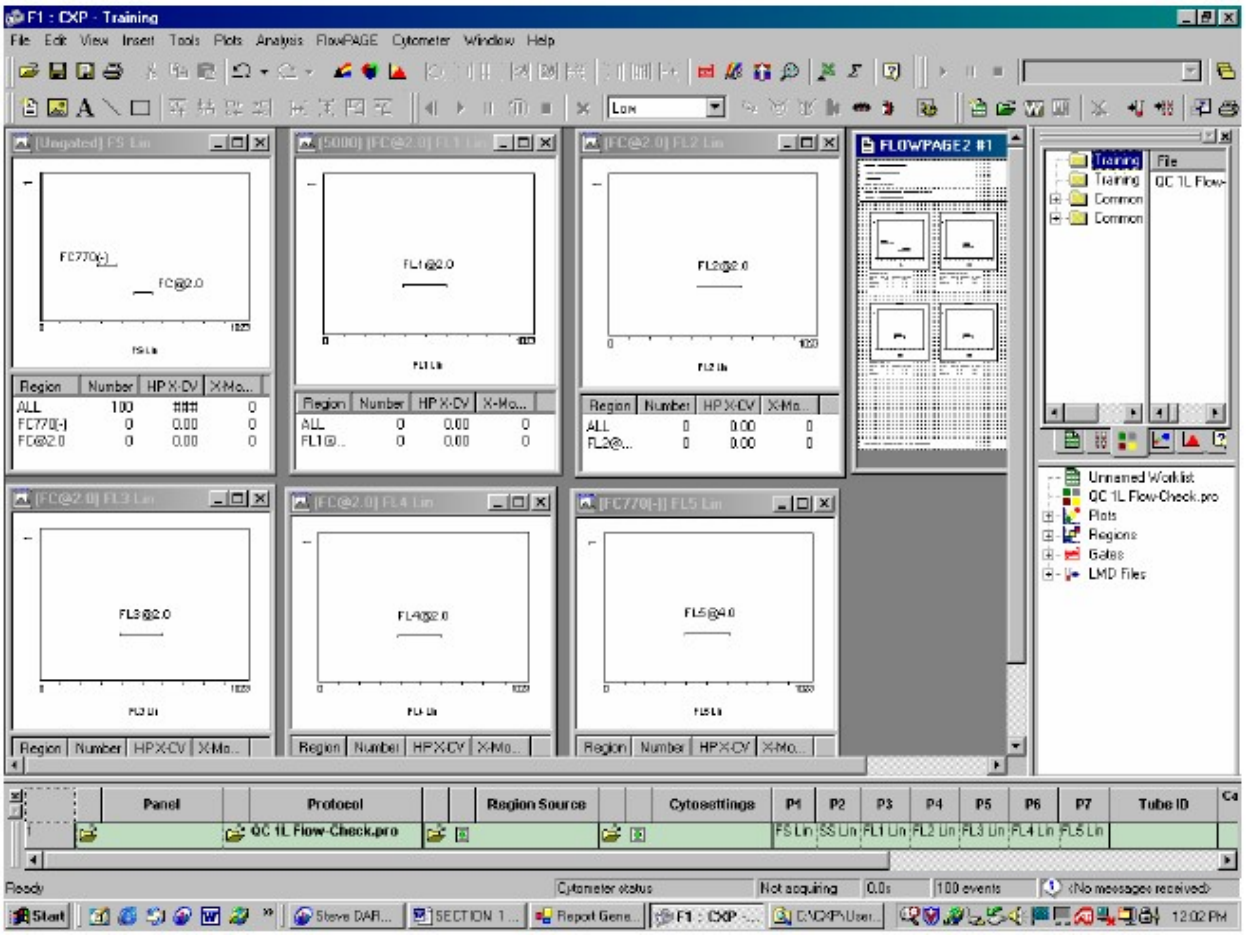
- Используя клавиши клавиатуры F9, F10, F11 или F12
- Используя соответствующие иконки на панели меню. Эту панель можно расположить в любом удобном для Вас месте на любом мониторе.



Место расположения панели Управление цитометром (Cytometer Controls)

Когда цитометр придет в рабочее состояние в правом нижнем углу экрана появляется сообщение Awaiting Sample. Теперь нужно загрузить протокол, который Вы собираетесь использовать для запуска флуоросфер FlowCheck. Для этого нужно обратиться к Resource Explorer.

В середине окна Resource Explorer расположено несколько вкладок, которые позволяют Вам изменять тип файлов, представленных в виде списка в правом верхнем углу. Например, выбрав вкладку Panel, Вы увидите все сохраненные панели, щелкнув на Protocol – все протоколы и т.д. В верхнем левом углу Resource Explorer расположены папки, доступные внутри Protocol, Panel и др. вкладок.
Если щелкнуть левой клавишей мыши по вкладке Protocol, то Вы увидите различные папки, например: Immunology (Acquisition), Immunology (Analysis), Common (Acquisition) и Common (Analysis). Immunology – пользовательская папка, имя ей присваивает администратор или Вы. Эта папка содержит пользовательские протоколы, у каждого пользователя может быть своя такая папка, защищенная паролем. В папке Common протоколы и панели общего пользования, такие как протоколы контроля качества, панели для промывки и т.д.
Выберите вкладку Protocol, папку Common (Acquisition). Щелкните левой клавишей мыши на протокол QC 1L Flow-Check™_ALIGN и перетащите его из окна Resource Explorer на рабочее пространство. Если в диалоговом окне появится вопрос о сохранении текущего протокола, выберите NO и протокол контроля качества появится на рабочем столе. Он выглядит примерно следующим образом:

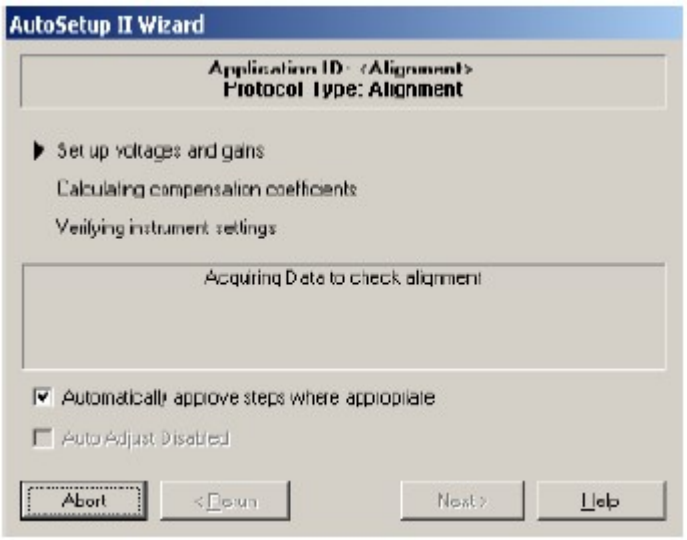


Теперь необходимо приготовить образец Flow-Check. Если Вы собираетесь проверять 1 лазер на 5 цветовых каналах, то нужно приготовить смесь стандартных флуоросфер Flow-Check и Flow-Check 770 в соотношении 2:1. Поставьте образец в цитометр. Выберите функцию Single Tube Fixed Position, которая позволяет не вводить номер карусели и идентификационный номер образца. Для этого щелкните мышью на иконку, расположенную на панели управления цитометром.

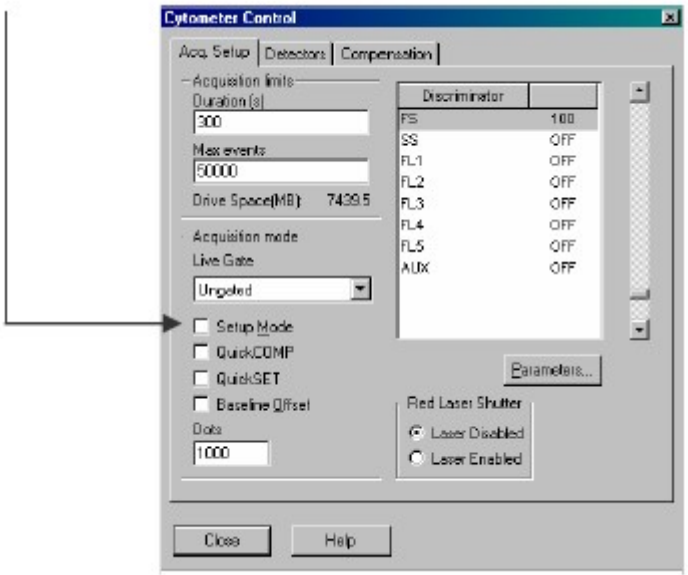


Карусель повернется. Поставьте образец в позицию №10, закройте карусель и нажмите START .

Появится сообщение AutoSetup II Wizard.



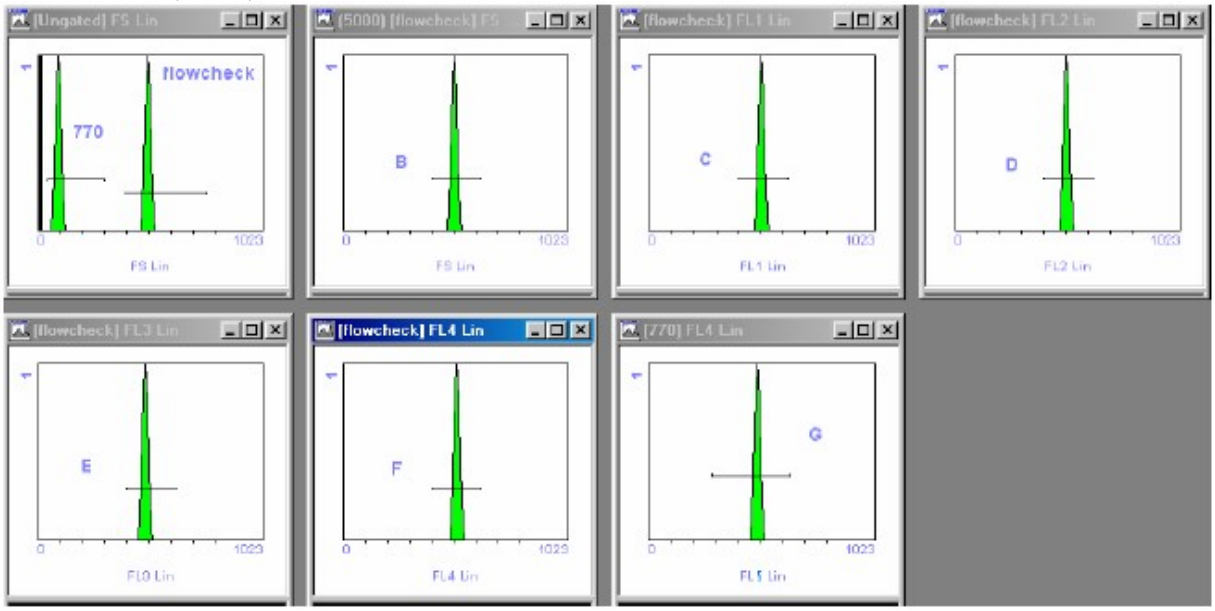
Обратитесь к окну Cytometer Controls. Выберите вкладку Acquisition Setup и найдите Setup Mode. Выделите эту функцию, щелкнув мышью в пустом квадрате.



Режим Setup Mode очень полезная функция, т.к. позволяет отменить любой из установленных ранее в гистограммах критериев: остановка сбора и сохранения данных, время и установленное максимальное количество событий. При этом происходит постоянное обновление картинки на дисплее. Такой режим дает достаточно времени для настройки протокола путем изменения настроек цитометра (вольтаж, усиление, дискриминатор, цветовая компенсация).

Если необходимо настройте вольтаж и усиление на каналах таким образом, чтобы пики Flow-Check попали внутрь линейных регионов, установленных на гистограммах. Когда Вы сочтете установленные настройки удовлетворительными, снимите выделение с Setup Mode и запустите сбор данных. Когда соберется примерно 5000

событий, забор пробы автоматически прекратится или, Вы можете остановить сбор самостоятельно, когда сочтете нужным (нажав иконку STOP). Результат должен выглядеть примерно так:



Обратитесь к AutoSetup II Wizard. Если все параметры «уложились» в допустимые нормы, то AutoSetup II Wizard предложит нажать кнопку Finish. Но, если какой-либо параметр не прошел проверку, Вы можете перезапустить FlowCheck (Rerun), прервать анализ (Abort) или все-таки принять полученные данные, нажав Finish.

Основная цель запуска FlowCheck – проверка правильной ориентации лазеров. Чем уже пики гистограмм, тем лучше ориентация лазеров. Чтобы описать ширину пика используют статистическую величину – полупиковый коэффициент вариации (Half Peak Coefficient of Variation). Приемлемой величиной HPCV считается <2% по FS, FL1, FL2, FL3 и FL4 и <4% по FL5.

(***Примечание***: если Вы тестируете 2 лазера, то HPCV должен быть <2% по FS, FL1, FL2, FL3, <2,5% по FS и FL4 для флуоросфер 675 FlowCheck и <4% для 770 FlowCheck по FL5.)

Дополнительно можно ежедневно проверять X-Mean для каждого параметра, чтобы удостовериться в том, что координаты пиков не изменяются изо дня в день. Но, имейте в виду, что значения могут изменяться при использовании FlowCheck из различных лотов.

Примечание: Настройку усилений на каналах в протоколе контроля качества нужно выполнять только при первичной настройке протокола и при переходе к флуоросферам FlowCheck из другого лота. В остальных случаях настройки изменять не следует. Значительный выход пиков за пределы установленных регионов может свидетельствовать о проблемах оптической системы прибора. В этом случае обратитесь в сервисную службу.

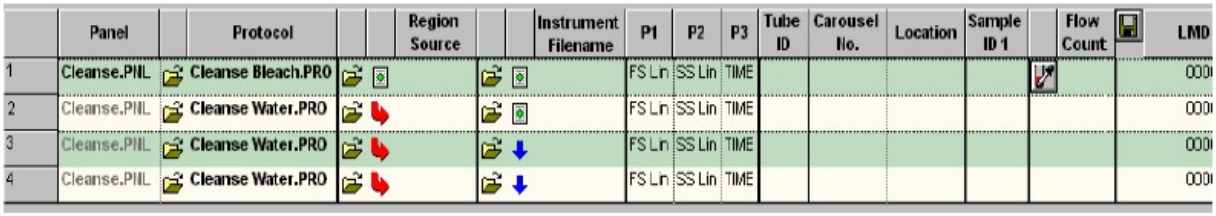
Выключение цитометра

Запуск панели промывки

Панель промывки Cleanse Вы найдете в папке Common во вкладке Panel. Щелкните левой клавишей мыши на вкладку Panel, затем выберите папку Common и в правом верхнем углу Вы увидите Cleanse Panel. Далее понятие панель будет рассмотрено подробно, если коротко, то панель - это группа связанных протоколов. Панель

Cleanse состоит из протоколов Bleach и Distilled Water. Вы можете найти эти протоколы во вкладке Protocol, в папке Common (Acquisition).
Панель не может быть загружена непосредственно на рабочий стол, как протокол. Сначала ее следует загрузить в Acquisition Manager. Подробнее Acquisition Manager будет рассмотрен позже, но в настоящий момент Вам выполнить следующую последовательность действий:

- Если Acquisition Manager нет на экране, выберите View-> Acquisition Manager.
- Выберите иконку New Worklist  на панели инструментов Acquisition Manager.
- Щелкните один раз левой клавишей мыши на панель Cleanse. Перетащите ее в окно Acquisition Manager или выберите иконку  на панели инструментов Acquisition Manager. Откроется панель:



	Panel	Protocol	Region Source	Instrument Filename	P1	P2	P3	Tube ID	Carousel No.	Location	Sample ID 1	Flow Count	LMD
1	Cleanse.PIL	Cleanse Bleach.PRO			FS Lin	SS Lin	TIME						000
2	Cleanse.PIL	Cleanse Water.PRO			FS Lin	SS Lin	TIME						000
3	Cleanse.PIL	Cleanse Water.PRO			FS Lin	SS Lin	TIME						000
4	Cleanse.PIL	Cleanse Water.PRO			FS Lin	SS Lin	TIME						000

- Приготовьте 1 пробирку с 0,5% раствором гипохлорита натрия или CLEANZ и в 3 пробирки налейте дистиллированной воды.
- Убедитесь, что функция Single Tube Position Mode не активирована. Поставьте пробирку с гипохлоритом натрия или CLEANZ в позицию 1, остальные в позиции 2-4. Введите номер карусели в соответствующую колонку Acquisition Manager. Нажмите START . (Примечание: Данные из протоколов Bleach и Cleanse не сохраняются как файлы данных).
- Убедитесь, что количество событий в последней пробирке с водой <100. Если больше 100, повторите промывку.

Очистка головки пробозаборника и зонда

- Аккуратно протрите вокруг головки пробозаборника кусочком газовой материи, смоченной 0,5% раствором гипохлорита натрия или CLEANZ.
- Повторите процедуру, используя кусочек газовой ткани, смоченной дистиллированной водой.

Промывка вакуумных линий

Активируйте холостой режим работы, нажав на иконку . Внизу экрана появится сообщение Press Idle Mode button to Initialize.
Заполните 2 очищающих адаптера дистиллированной водой. Поставьте их в позиции 1 и 2 таким образом, чтобы резервуары были направлены в центр карусели (для приборов с каруселью). Нажмите иконку с изображением адаптера , чтобы запустить процесс промывки. Когда процедура закончится, снова нажмите  для отмены холостого режима работы.
Протрите все поверхности сначала 0,5% раствором гипохлорита натрия, затем водой.
Выйдите из программы CXP, выбрав File->Exit.

Выключите цитометр, щелкнув на иконку 

на рабочем столе Windows или в стартовом меню.

Раздел 6 –Acquisition Manager (Управление сбором данных)

Acquisition Manager используют для составления рабочего списка образцов, которые Вы собираетесь анализировать. Протоколы и панели можно перетащить мышкой из Resource Explorer в Acquisition Manager или открыть, нажав на иконку .



Панель инструментов Acquisition Manager выглядит следующим образом:



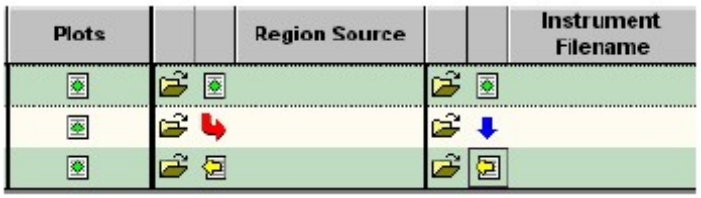
Acquisition Manager можно использовать для анализа образцов и в режиме Single Tube Mode и MCL Automatic и MCL Manual Mode.

Acquisition Manager columns

Panel – Эта колонка содержит список всех панелей, которые были загружены в Acquisition Manager.

Protocol - Эта колонка содержит список всех протоколов, которые были загружены в Acquisition Manager.

Plots, Region Source, Instrument Filename – Символы в этих колонках указывают как графики, регионы и настройки протоколов будут передаваться от одной строки Acquisition Manager к другой. Существует 3 возможности:



 - означает, что графики, гейты, регионы и настройки будут использоваться из текущего протокола.

 - передает положение регионов и настройки предыдущего протокола, а настройки текущего протокола игнорируются.

 - передает положение регионов первого протокола рабочего списка.

Это очень удобно при анализе в панелях, когда положение регионов и настройки устанавливаются на контрольном образце, а затем используются для последующих.

 - означает, что положение регионов и настройки загружены из другого файла.

Parameters – В колонках, обозначенных как P1, P2, P3 и т.д. указаны параметры, выбранные для анализа в данном протоколе, т.е. FS, SS, FL1 и т.д. Эти колонки можно использовать для обозначения осей графиков в конкретном протоколе. Подписи осей будут обновляться на графиках при запуске анализа образца. Если активировать функцию Save Protocol в Workspace Preferences -> Acquisition Option tab, то названия осей будут автоматически сохраняться в протокол.

Tube ID - колонка предназначена для введения штрих-кода пробирки. Информация считывается с помощью сканера карусели, если считывания не происходит, в колонке появляется сообщение об ошибке.

Carousel and Location – в колонке указывают номер карусели и позиции. Изменяя номер позиции Вы можете анализировать пробы в произвольном порядке.

Sample ID – идентификатор образца. Можно использовать до 4-х идентификаторов для обозначения образца (Sample ID1, Sample ID2 и т.д.). Как изменять количество идентификаторов смотрите ниже в Customize Worklist Columns.

LMD filename – указывает имя, которое присваивается файлу, создаваемому в результате анализа образа. Чтобы Sample ID автоматически присоединялся к имени файла нужно указать это в Workspace Preferences -> LMD filename tab.

Stop Condition and Stop Value – в колонке можно указать новые условия остановки анализа в данном протоколе (время и количество событий). При этом старые установки отменяются.

Customize Worklist Columns – изменение перечня колонок рабочего списка. Чтобы открыть эту опцию щелкните правой клавишей мыши на заголовках колонки или



нажмите иконку  в панели инструментов Acquisition Manager.

В открывшемся окне можно выбрать нужные названия колонок или переименовать их. Чтобы присвоить новое имя колонке, щелкните левой клавишей мыши на имени, затем напишите новое. Также можно изменить порядок колонок путем перетаскивания их на нужное место непосредственно в Acquisition Manager.

Если Вы постоянно анализируете одну и ту же группу образцов, то можно сохранить рабочий список, нажав иконку  в панели инструментов. Чтобы загрузить сохраненный рабочий список, нажмите . Для очистки рабочего списка нажмите иконку .

Раздел 3 - Распечатка отчета по пациентам из базы данных

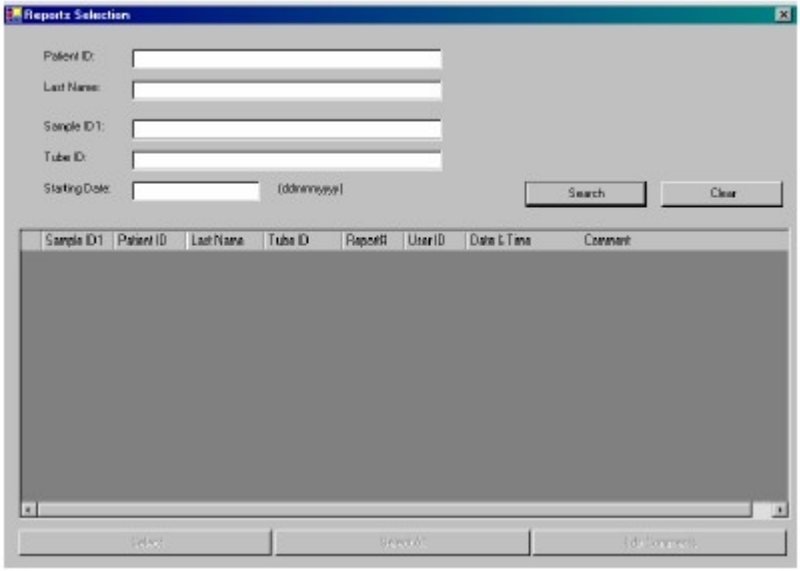
Разверните панель инструментов Report Generator (Генератор отчета), которая расположена внизу экрана.



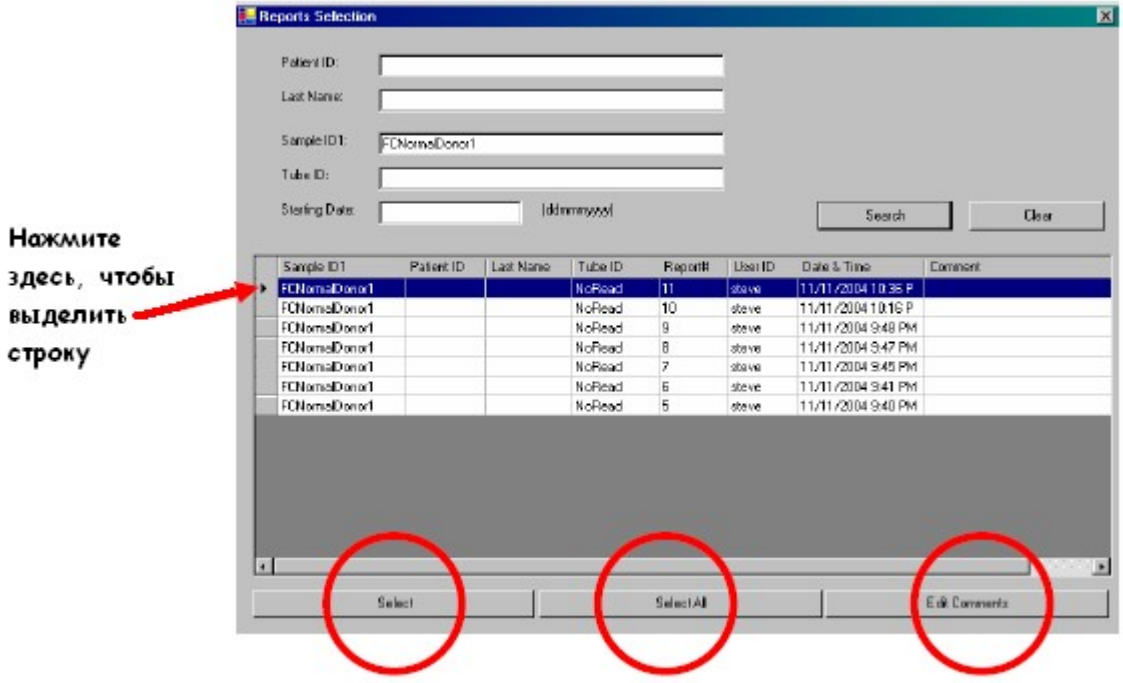
Для распечатки отчета из базы данных нажмите иконку Panel Report:



Откроется окно Report Selection (выбор отчета).



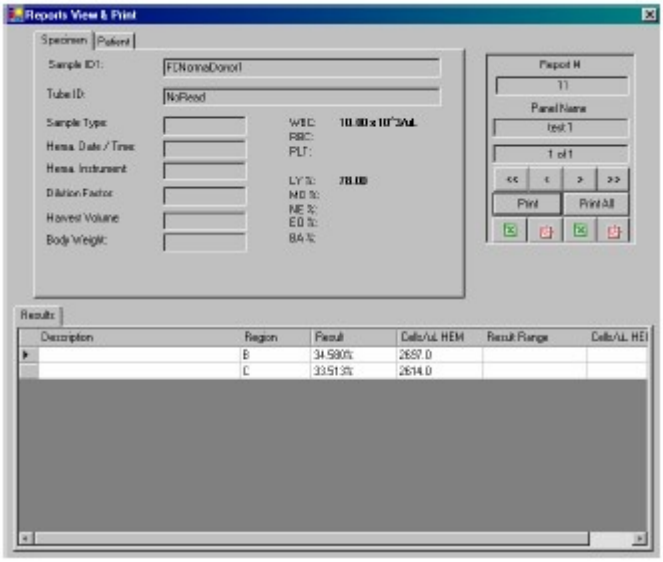
Введите критерии поиска в строки: Sample ID1 или другие, и нажмите Search. Появится список отчетов, соответствующих критериям поиска.



Выделите все строки, которые Вы хотите распечатать и нажмите Select. Если вы хотите распечатать все отчеты, соответствующие выбранным критериям, нажмите

Select All. Если Вы хотите добавить какие-то комментарии – нажмите Edit Comments.

После того как Вы нажали Select или Select All появится окно Reports View and Print.



Из этого окна Вы можете распечатать отчеты или создать версии отчетов в форматах PDF или XLS.

Операции для продвинутого пользователя

Раздел 2 – Создание протокола

Протокол – это набор инструкций, который сообщает проточному цитометру какие параметры необходимо регистрировать, какие использовать настройки и как должны быть представлены полученные данные.

В качестве примера в данном разделе будет предложено создать двуцветный протокол для анализа клеток, окрашенных антителами мечеными FITC и PE.

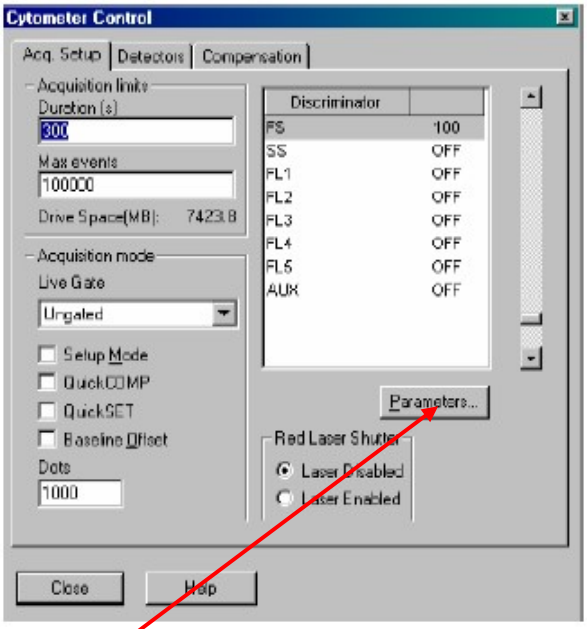
Необходимые материалы:

- Лейкоциты цельной крови, окрашенные IgG1-FITC и IgG1-PE.

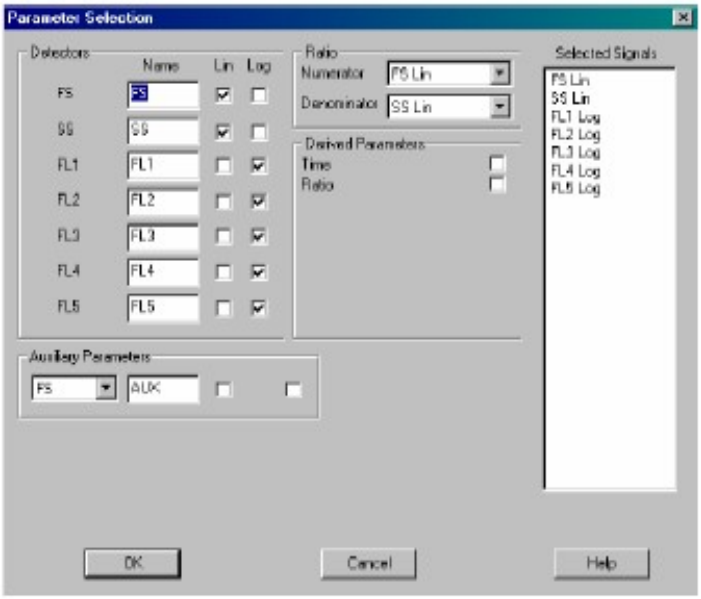
Шаг 1 – Выбор анализируемых параметров

- Выберите File->New->New Protocol. Появится протокол, предлагаемый по умолчанию. Теперь выберите иконку управления цитометром Cytometer Control:

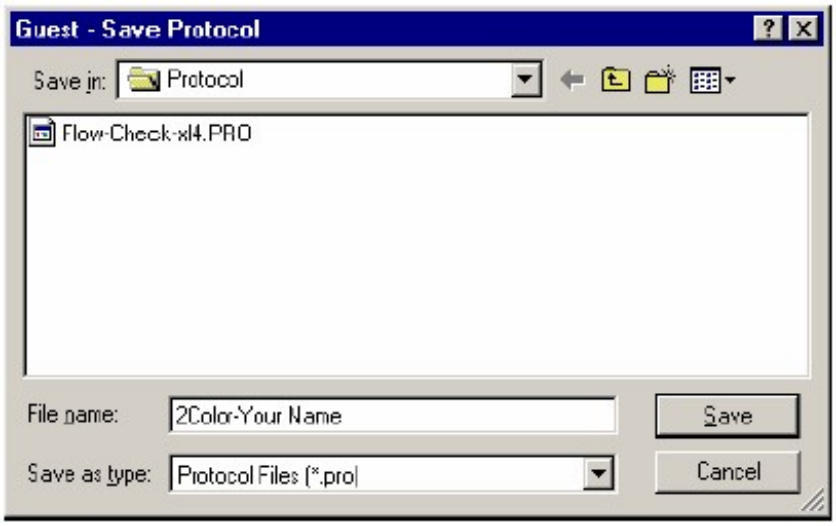




- Нажмите кнопку Parameters, отроется окно:



- Теперь Вы можете отметить нужные параметры. Например, для создания двуцветного протокола, нужно отметить FS Lin, SS Lin, FL1 Log и FL2 Log.
- CXP предложит Вам сохранить протокол, т.к. были изменены измеряемые параметры. Сохраните протокол, присвоив ему уникальное имя.



Шаг 2 – *Создание диаграмм*

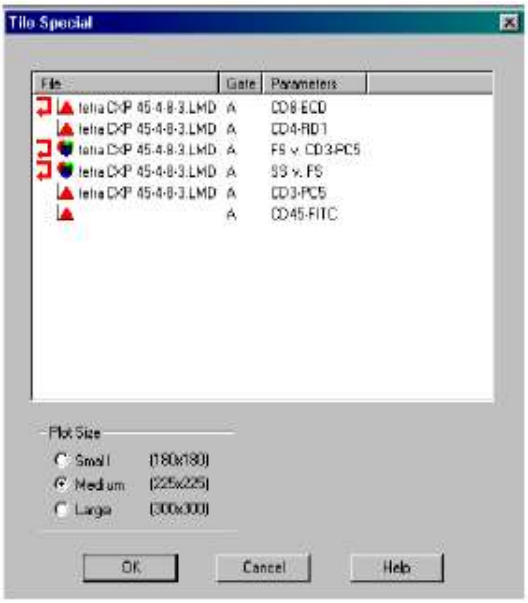
Среди цитометрических диаграмм различают Dot Plot – точечное изображение и гистограммы.

Создание Dot Plot:

- Выберите иконку  на панели инструментов. Установите по оси X параметр SS, а по оси Y параметр FS, нажмите OK.
- Снова выберите иконку  на панели инструментов. Установите по оси X параметр FL1, а по оси Y параметр FL2, нажмите OK.

Создание гистограмм:

- Выберите иконку  на панели инструментов. Установите параметр FL1 Log, нажмите OK.
- Снова выберите иконку  на панели инструментов. Установите параметр FL2 Log, нажмите OK.
- Вы можете расположить полученные диаграммы в произвольном порядке или воспользоваться опцией Tile Special. Для этого нажмите [Ctrl T] или выберите Windows->Tile Special. Откроется список Ваших диаграмм. Например:

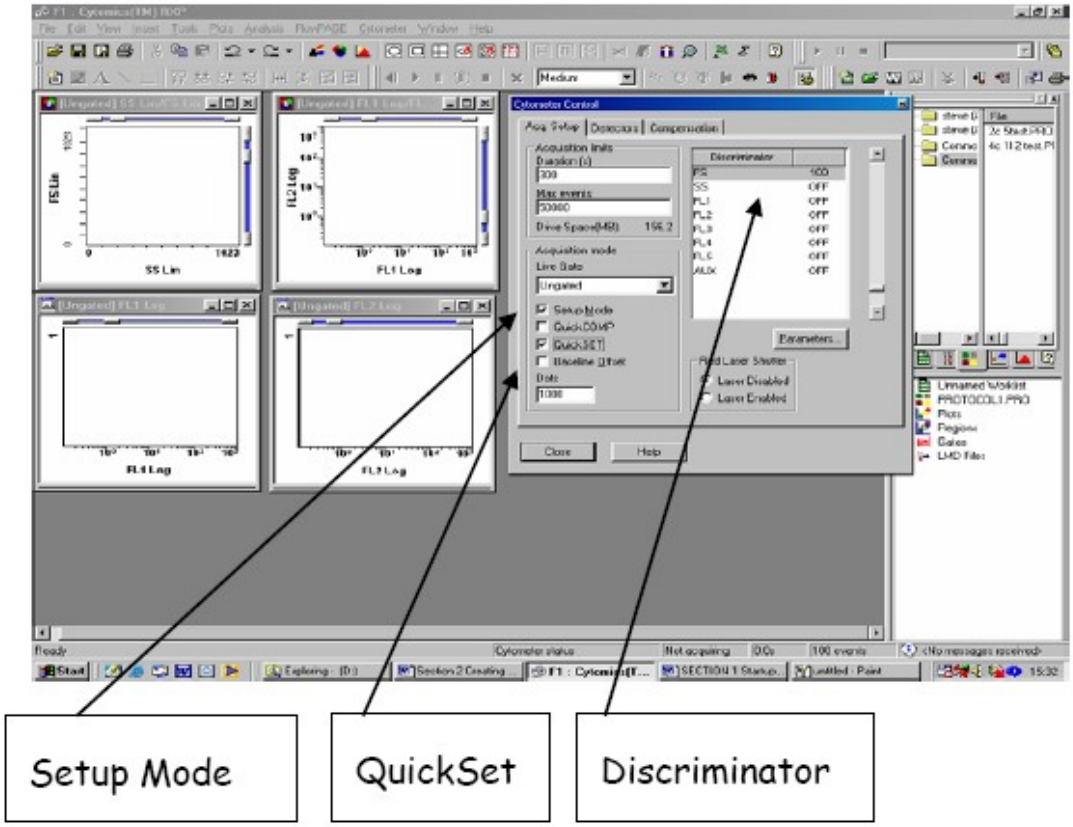


Красная изогнутая стрелка перед диаграммой указывает на то, что эта диаграмма будет расположена с новой строки на рабочем столе. Щелчок мыши по стрелке отменяет действие, после повторного щелчка по полю перед названием диаграммы стрелка вновь появляется. Вы можете изменить размер диаграмм в графе Plot Size, отметив маленький (small), средний (medium) или большой (large).

Шаг 3 – Настройка протокола

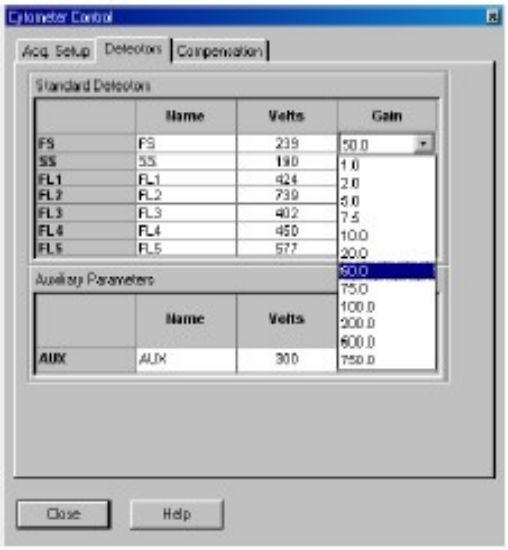
Теперь можно запустить пробу и настроить усиления на каналах светорассеивания и флуоресценции.

- Выберите вкладку Setup Mode в окне Cytometer Control, отметьте щелчком мыши Quick Set и удостоверьтесь, что функция Baseline Offset **отключена**.
- Выберите вкладку Discriminator в окне Cytometer Control.
- Установите на FS значение 100, а остальные отключите.

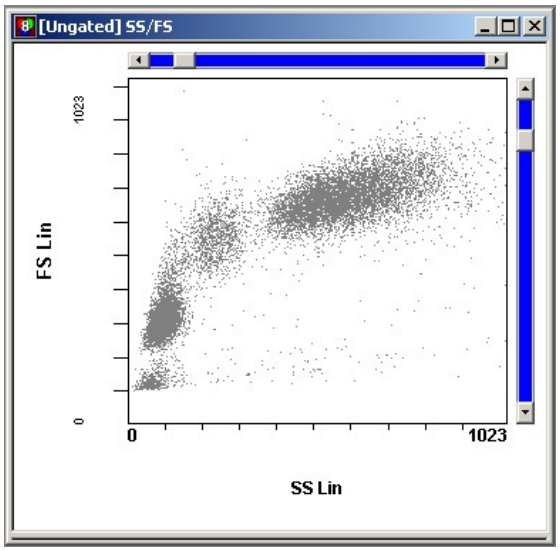


- Используйте функцию Single Fixed Tube Mode и поставьте пробирку в позицию 10 (см. раздел 1). Запустите анализ, нажав иконку СТАРТ. Так как Вы выбрали режим QuickSet, по периметру диаграмм появятся полоски с бегунками для регулировки. Сначала настройте первую диаграмму SS-FS. С помощью мыши Вы можете произвольно перемещать бегунок, щелчки по полю полоски перемещают бегунок большими шагами по 10 вольт, на стрелки по краям полоски – по 1 вольту. Вслед за бегунком будет перемещаться и клеточная популяция.

Примечание: Полосы QuickSet позволяют настраивать только вольтаж. Если требуется изменить усиление (Gain), нужно обратиться к вкладке Detectors в окне Cytometer Control, выделить параметр (например, FS или SS) и выбрать нужное усиление.



Цель настройки каналов FS и SS – переместить облака клеток таким образом, чтобы интересующие Вас популяции полностью были видны на Dot Plot, например, как на рисунке:

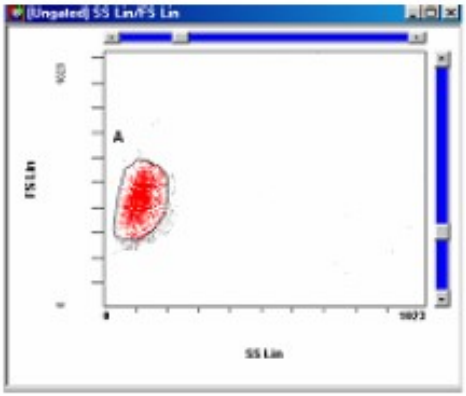


При настройке протокола для анализа лейкоцитов человека, как правило, наиболее типичные настройки усиления (gain) по каналам FS и SS следующие: Gain по FS – 5, Gain по SS – 20, Discriminator по FS – 100. Эти значения могут быть индивидуальными для каждого FC500, но именно такие настройки чаще всего позволяют вывести популяции на DotPlot полностью.

Шаг 4 – Гейтирование

Теперь необходимо выделить популяцию для анализа. Для этого вокруг интересующей популяции (в нашем случае – лимфоциты) рисуют контур таким образом, чтобы за пределами контура остались все события, не являющиеся лимфоцитами (дебрис, моноциты).

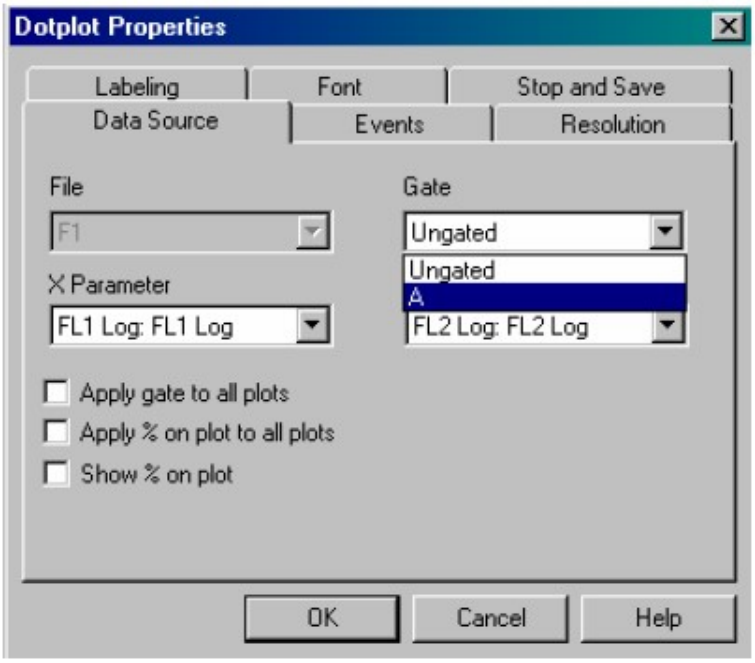
- Активируйте DotPlot FS-SS, щелкнув по нему мышкой. Затем выберите иконку  на панели инструментов. Также можно воспользоваться меню Analysis -> Create Region -> Polygonal Region.
- Щелкните мышкой вблизи облака лимфоцитов и нарисуйте вокруг него контур. Программа автоматически присвоит этому региону имя «A».



- Если нужно, Вы можете переименовать регион, например в Lymph. Для этого сделайте двойной щелчок мышкой на букву «A» и введите новое имя или выделите

регион щелчком левой клавиши мыши, а затем сделайте правый щелчок и выберите Region Properties.

- Теперь нужно указать в DotPlot FL1-FL2 анализируемый регион, то есть гейтировать FL1-FL2 по региону «A». Для этого активируйте диаграмму FL1-FL2 щелчком мыши, сделайте правый щелчок и выберите Format Plot. ИЛИ переместите указатель мыши в правый нижний угол диаграммы и дождитесь появления иконки >>> и щелкните левой клавишей мыши. Откроется окно Format Dot Plot. Выберите вкладку Data Source и установите Gate A. Нажмите OK.

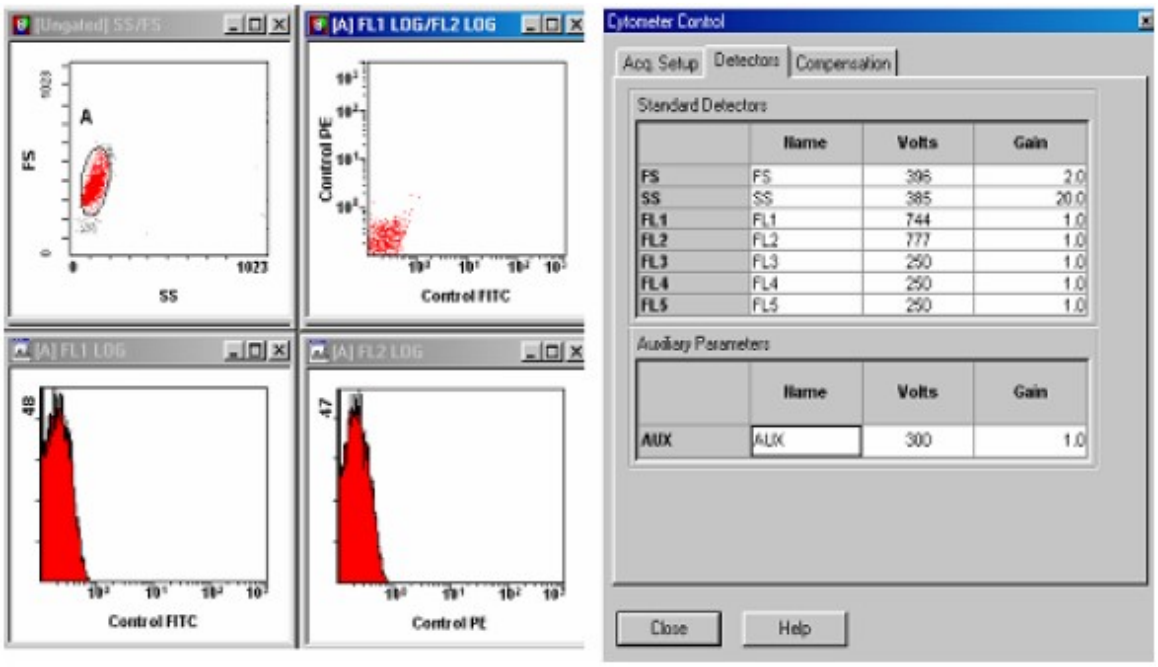


Повторите процедуру гейтирования по региону A для остальных гистограмм.

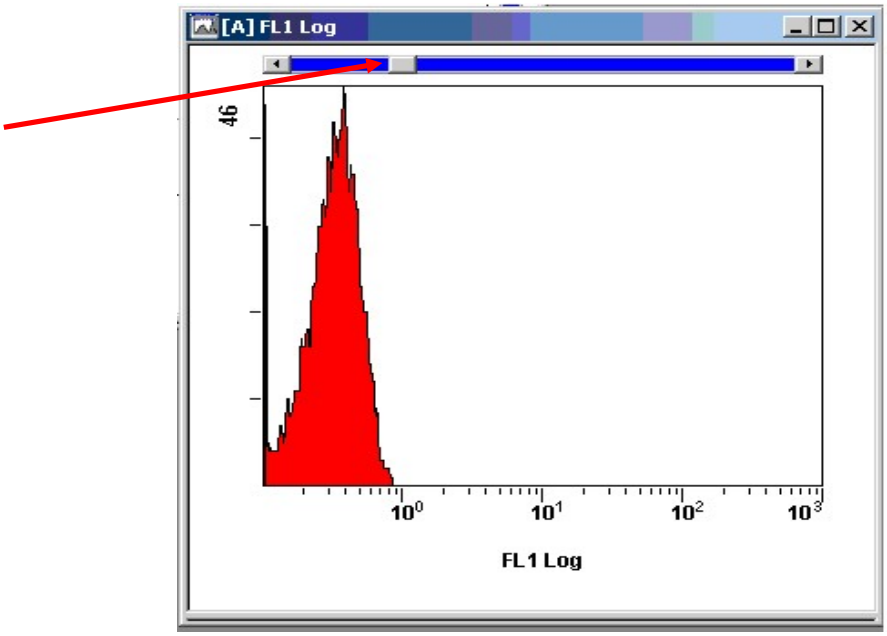
Шаг 5 – Настройка каналов флуоресценции

Теперь необходимо настроить напряжение на детекторах флуоресценции FL1 и FL2. Сначала устанавливают фоновую флуоресценцию. Для этого используют изотипический контроль. Изотипический контроль – это клетки, окрашенные иммуноглобулином того же изотипа, что и используемые специфические антитела. Кроме того, иммуноглобулины должны быть конъюгированы с тем же флуорохромом, что и специфические антитела. Изотипический контроль позволяет нам определить, какова степень неспецифического связывания иммуноглобулинов данного изотипа с исследуемыми клетками и учесть этот факт при оценке специфического окрашивания. В данном случае в качестве изотипического контроля будут использованы клетки, окрашенные IgG1-FITC и IgG1-PE.

Обычно, напряжение на каналах флуоресценции стараются установить таким образом, чтобы пик изотипического контроля находился в пределах первой декады логарифмической шкалы, как показано на рисунке.



Для настройки напряжения также можно использовать режим Quick Set и производить плавную регулировку с помощью бегунка.

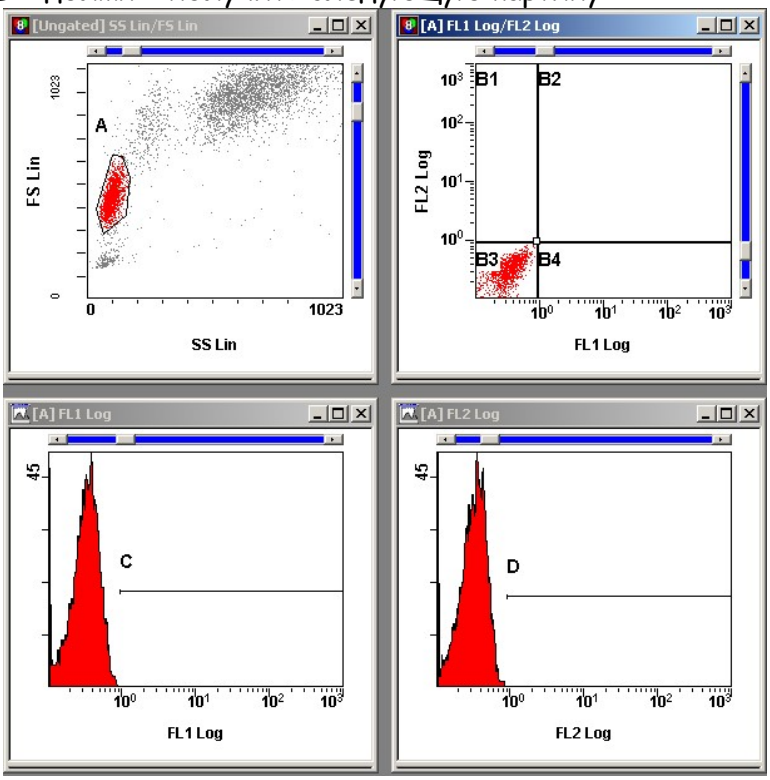


Шаг 6 – Установка регионов на диаграммах

Теперь можно установить регионы на диаграммах флуоресценции, чтобы ограничить негативную популяцию.

- Выделите DotPlot FL1-FL2.

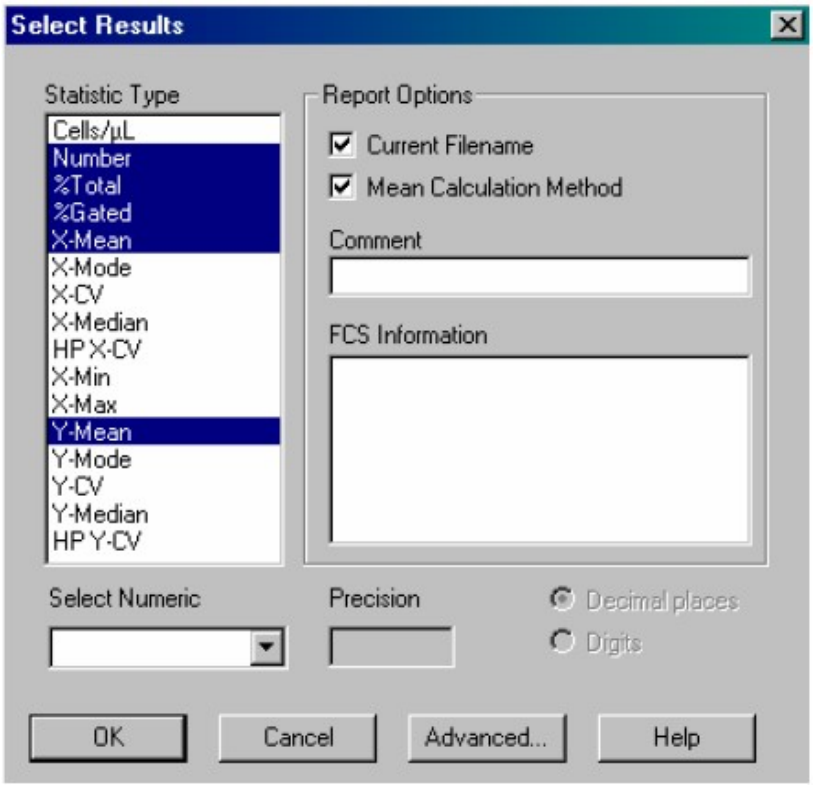
- Выберите иконку  ИЛИ Analysis->Create Region-> Quadrant region.
- Щелкните левой клавишей мыши на DotPlot, появится крестообразный курсор, который нужно поставить таким образом, чтобы негативная популяция оказалась в нижнем левом квадранте. Еще раз щелкните мышкой, чтобы зафиксировать положение региона. Региону автоматически присваивается имя «B».
- Выделите гистограмму FL1.
- Выберите иконку  ИЛИ нажмите Analysis -> Create Region -> Linear region. Щелкните мышкой на гистограмму и установите левый край региона к правому краю пика и зафиксируйте положение щелчком мыши. Региону автоматически присваивается имя «C».
- Повторите процедуру для гистограммы по FL2.
- В результате Вы должны получить следующую картину:



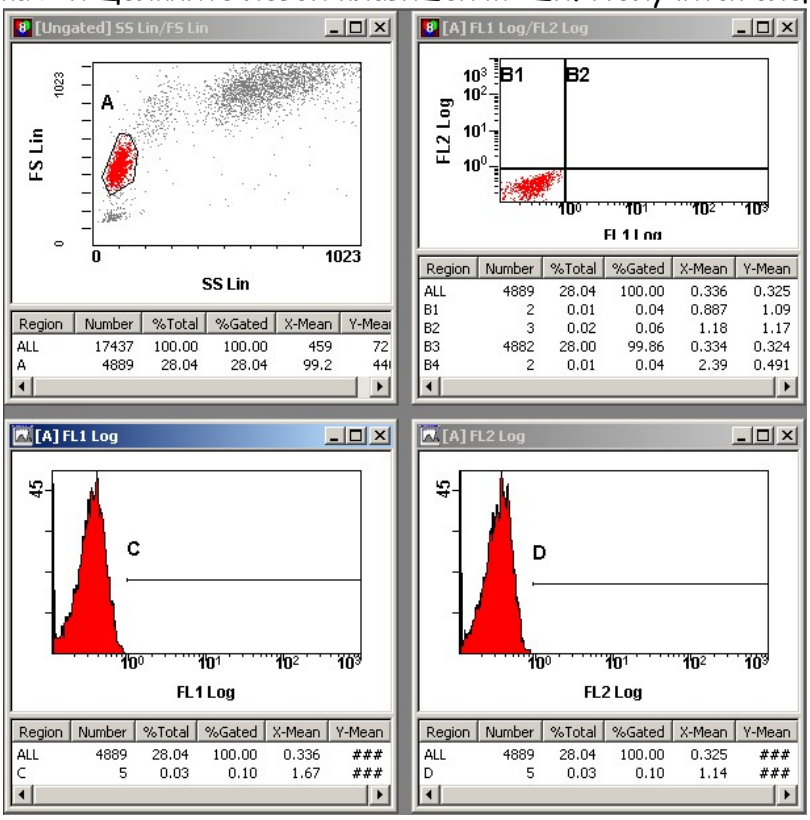
Шаг 7 – Добавление статистики

Чтобы увидеть численное представление результата, необходимо вывести на экран статистику анализа.

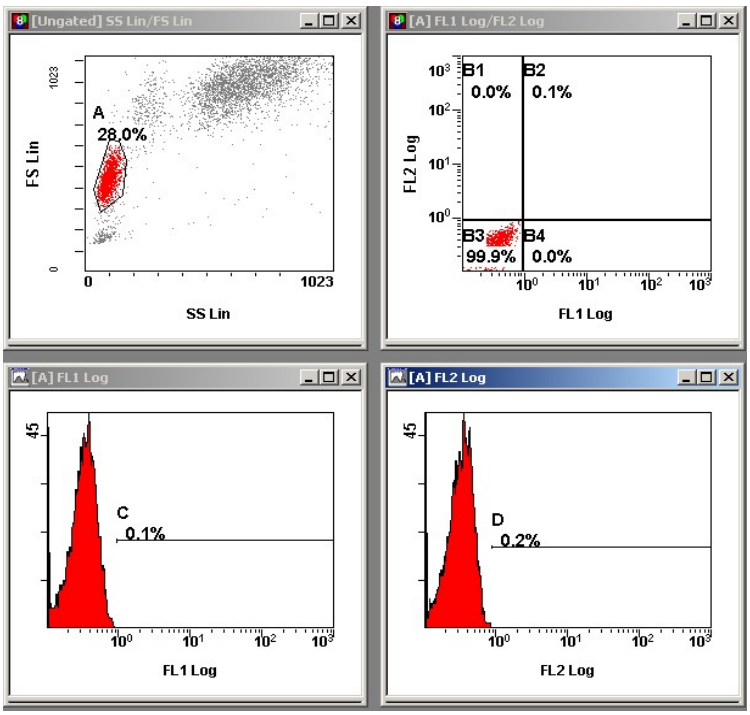
- Сначала нужно выбрать интересующие Вас статистические параметры. Для этого нажмите Analysis-> Select Results.
- Выберите нужные параметры, например: Number, %Total, %Gated, X-Mean, Y-Mean. Нажмите OK.



- Чтобы таблица статистики появилась внизу каждой диаграммы, переместите указатель мышки в левый нижний угол соответствующей диаграммы, дождитесь появления значка Σ и щелкните левой клавишей мыши. Получится следующее:



Кроме того, Вы можете вывести основные значения непосредственно на поле диаграммы, если в свойствах диаграммы (окно Format Plot) отметите **Show % on Plot** и **Apply % on Plot to all Plots**. Результаты будут представлены следующим образом:



В нижнем левом квадранте диаграммы FL1-FL2 должно содержаться не менее 98% событий. Если нет, то попробуйте подкорректировать положение регионов.

Снимите выделение Setup Mode в окне Cytometer Control. Сохраните протокол, нажав иконку  или [Ctrl S].

Если Вы собираетесь выполнять одноцветный анализ, то можно считать Ваш протокол готовым. Если планируется 2 и более метки, то необходимо выполнить процедуру, называемую цветовой компенсацией.

Раздел 3 – Цветовая компенсация

Цветовая компенсация необходима, если Вы планируете выполнять 2, 3, 4 или 5-цветный анализ.

Необходимые материалы:

- Лимфоциты, окрашенные CD3-FITC и CD19-PE.

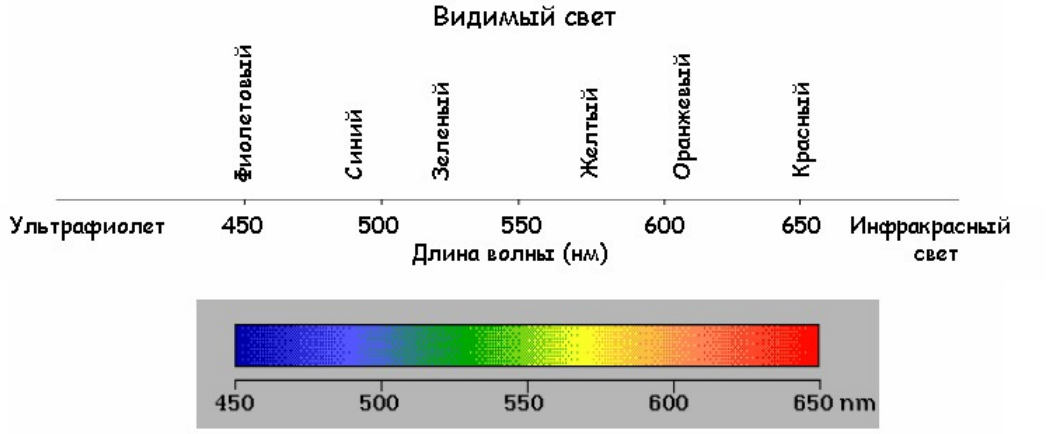
Что такое цветовая компенсация?

Цветовая компенсация – это электронное вычитание сигналов, исходящих из фотоумножителей. Эта операция дает возможность корректировать перекрывание флуоресцентных сигналов.

Почему нужно выполнять цветовую компенсацию?

Цветовую компенсацию необходимо выполнять, чтобы быть уверенным в том, что регистрируется сигнал из определенного источника, а не результат перекрывания флуоресцентных сигналов.

Чтобы понять, почему происходит перекрывание сигналов нужно вспомнить шкалу спектра света:



Видимый спектр (приблизительно)

В FC500 используется аргоновый лазер, который испускает свет с длиной волны 488 нм, и красный диодный лазер с длиной волны 633 нм. Лазеры коллинеарны, т.е. лучи обоих лазеров направлены точно в одно и то же место проточной ячейки.

Красители, которые используются на FC500, должны возбуждаться светом обоих лазеров и испускать свет определенного спектра. Разница между длиной волны возбуждения (поглощения) и эмиссии называют сдвигом Стокса. Чем больше эта разница, тем лучше разрешение сигнала.

Наиболее распространенные красители в проточной цитофлуориметрии:

- FITC (Fluorescein Isothiocyanat, флуоресцеин изотиоцианат) один из наиболее распространенных красителей в проточной цитометрии. Длина волны возбуждения этого красителя – 488 нм.

  Длина волны эмиссии (испускания) FITC преимущественно в зеленом спектре с пиком эмиссии 525 нм, но также испускается синий и зеленый свет.

- PE – Phycoerythrin, фикоэритрин, также известен как RD1 (Red Dye 1). Длина волны возбуждения 488 нм, испускание преимущественно в желтом спектре с пиком 575 нм, но также выходит зеленый и оранжевый.
- ECD – Energy Coupled Dye, тандемный краситель из PE и Техасского красного (Texas Red). Длина волны возбуждения 488 нм, пик эмиссии 610 - 635 нм. Этот краситель регистрируется третьим детектором FC500 (FL3).
- PC5 (PeCy5) - тандемный краситель из PE и цианина 5 (Cyanine 5). Длина волны возбуждения 488 нм, пик эмиссии 660 - 680 нм. Этот краситель регистрируется четвертым детектором FC500 (FL4).
- PC7 - тандем PE и Cyanine 7. Длина волны возбуждения 488 нм, пик эмиссии 750 - 810 нм. Этот краситель регистрируется пятым детектором FC500 (FL5).
- APC – allophycocyanin, аллофикоцианин. Длина волны возбуждения 633 нм. Для работы с этим красителем нужно использовать красный лазер и регистрировать флуоресценцию на четвертом канале (FL4).

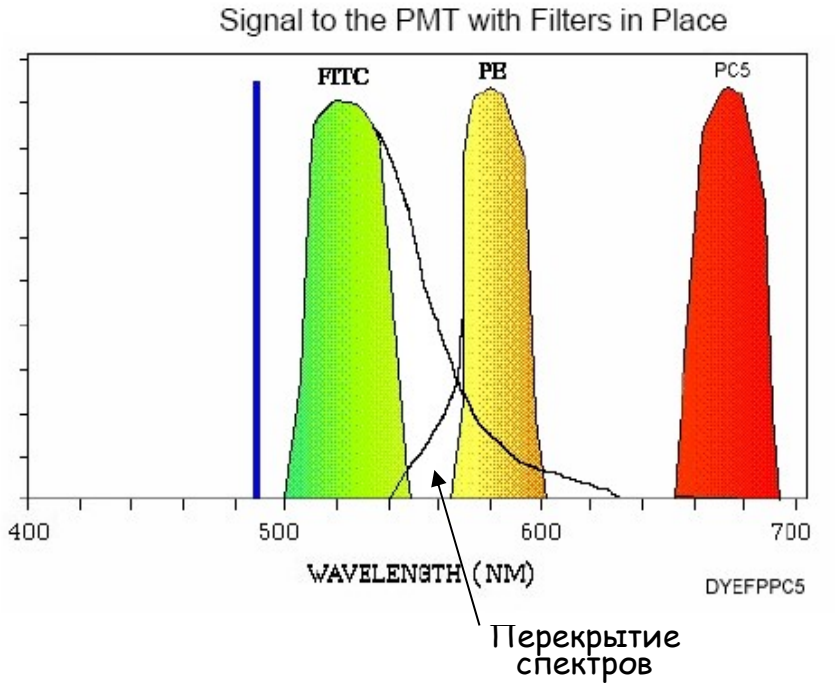
При многоцветном анализе в пробу добавляется второй краситель, например, фикоэритрин (PE) или третий, например, фикоэритрин-цианин-5 (PC5) и т.д. Такой прием позволяет получить больше информации из одной пробирки, сокращает количество проб, однако требует проводить настройку цветовой компенсации.

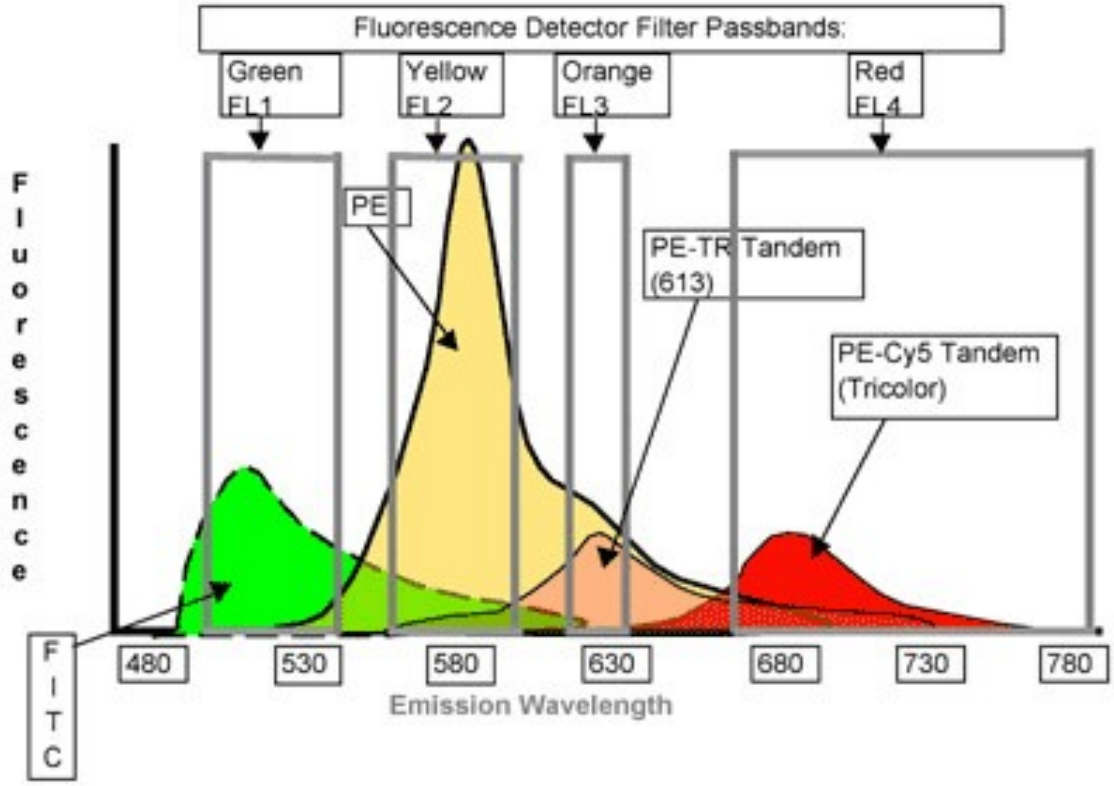
При работе на FC500 Вы можете использовать следующие комбинации красителей, либо другие красители со сходными характеристиками:

Кол-во красителей	Лазер	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5
4	488 нм	FITC	PE	ECD	PC5	-
5	488 нм	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
4	488 нм 633 нм	FITC	PE	ECD	APC	-
5	488 нм 633 нм	FITC	PE	ECD	APC	PC7

Перекрытие спектров

Как было сказано выше, кривые эмиссии различных флуоресцентных красителей перекрываются. Это также относится к перекрытию спектров и основная цель процесса цветовой компенсации - разделить соответствующие кривые эмиссии. Использование узкополосных фильтров, расположенных перед каждым детектором флуоресценции, способствует разделению сигналов, но не предотвращает перекрытие спектров.



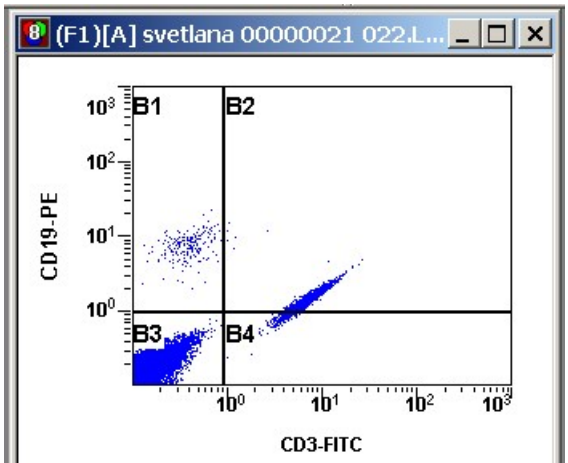


- Детектор PE регистрирует зеленый свет от FITC и детектор FITC регистрирует желтый свет от PE.
- Детектор FITC не может отделить небольшой желтый сигнал, получаемый от PE и зеленый от FITC.
- Детектор PE не может дифференцировать небольшой зеленый сигнал, получаемый от FITC и желтый от PE.
- Также на детектор PC5 попадает небольшое количество желтого света от PE, а на детектор PE - красный свет от PC5.

- Внешний сигнал, получаемый с соседнего красителя, можно вычесть из анализа электронными средствами. Эта процедура электронной коррекции перекрывания спектров называется цветовой компенсацией.
- Правила, используемые для двуцветной компенсации, работают и при большем количестве красителей.

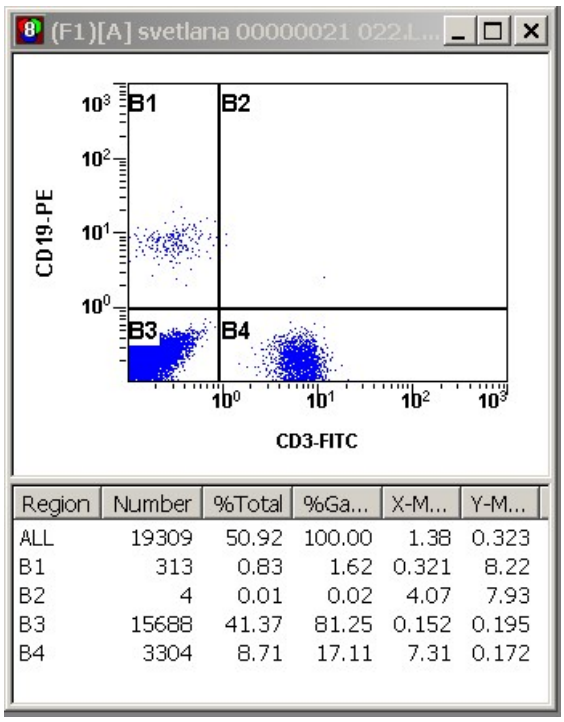
Компенсация флуоресценции

Когда Вы запустите анализ пробы, окрашенной анти-CD3-FITC и анти-CD19-PE, в только что созданном двуцветном протоколе, скорее всего, Вы получите следующую картину:



Region	Number	%Total	%Ga...	X-M...	Y-M...
ALL	19309	50.92	100.00	1.38	0.528
B1	309	0.81	1.60	0.423	8.18
B2	3022	7.97	15.65	7.62	1.58
B3	15688	41.37	81.25	0.151	0.17
B4	290	0.76	1.50	3.89	0.818

Видно, что популяция CD3-позитивных клеток оказалась в квадранте B2, где должны находиться клетки, позитивные по двум маркерам. Однако нам известно, что в данной пробе нет дубль-позитивных клеток, Т-клетки не могут экспрессировать В-клеточный маркер CD19. Мы наблюдаем завышенную флуоресценцию на канале FL2 за счет добавочной флуоресценции от FITC (вследствие перекрывания спектров). Т.е., нужно вычесть из сигнала, регистрируемого на FL2 часть сигнала, который засвечивает с соседнего детектора FL1: (FL2-%FL1). Величина %FL1 подбирается эмпирически и для этого существуют некоторые критерии. Результатом правильного подбора этой величины должна стать следующая картина:

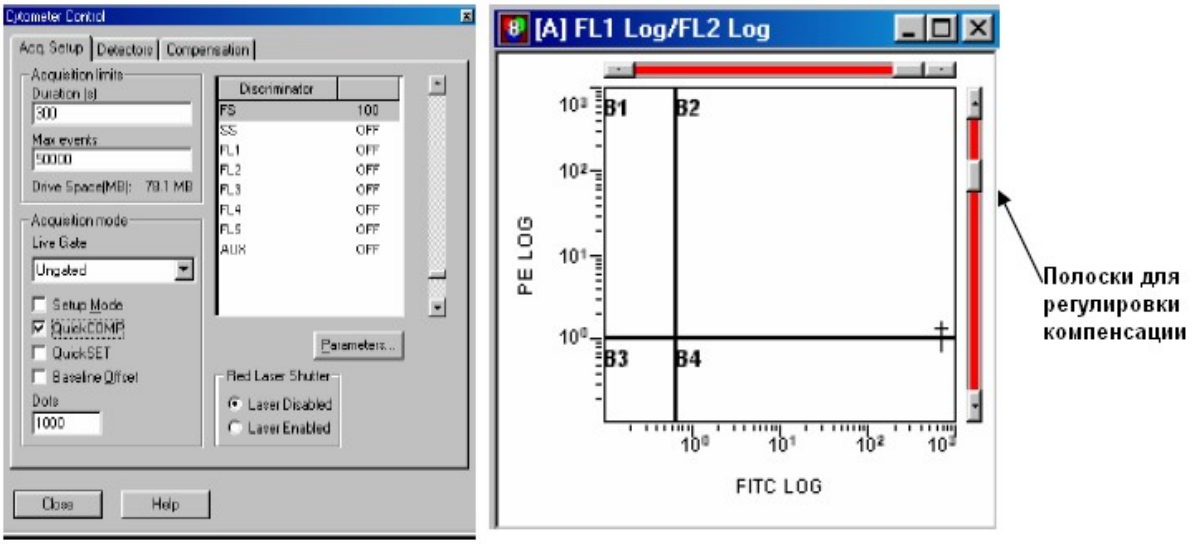


Region	Number	%Total	%Ga...	X-M...	Y-M...
ALL	19309	50.92	100.00	1.38	0.323
B1	313	0.83	1.62	0.321	8.22
B2	4	0.01	0.02	4.07	7.93
B3	15688	41.37	81.25	0.152	0.195
B4	3304	8.71	17.11	7.31	0.172

Как осуществляется цветовая компенсация на практике?

Откройте Ваш двуцветный протокол.

- Убедитесь, что в окне Cytometer Control активированы режимы Setup Mode и QuickComp. Когда Вы отметите QuickComp, на двухпараметрической диаграмме появятся красные полоски.



- Выберите Вкладку Compensation, и появится таблица цветовой компенсации.
- Запустите анализ образца CD3-FITC/CD19-PE. Используйте функцию Fixed Single Tube Mode.
- Сдвиньте с помощью мышки ползунок на вертикальной полоске диаграммы FITC-PE вниз. Теперь посмотрите на таблицу компенсации и Вы увидите, что одно из значений в ней изменилось. Популяция клеток переместилась из квадранта 2 по направлению к квадранту 4. Щелчок по стрелкам, расположенным на концах

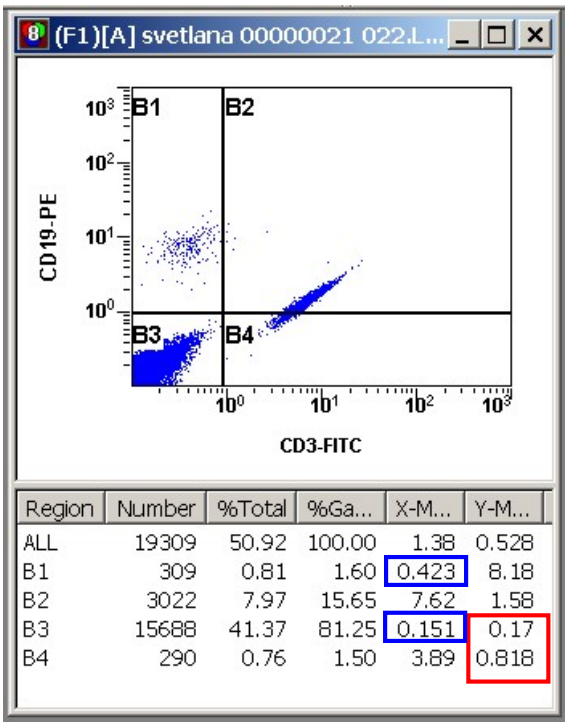
полосок изменяет величину компенсации на 0,1%, по красному полю полосы – на 1%. Добавляйте цветовую компенсацию до тех пор, пока популяции в квадрантах B1 и B3 не окажутся примерно на одном уровне.

Критерии нормальной цветовой компенсации

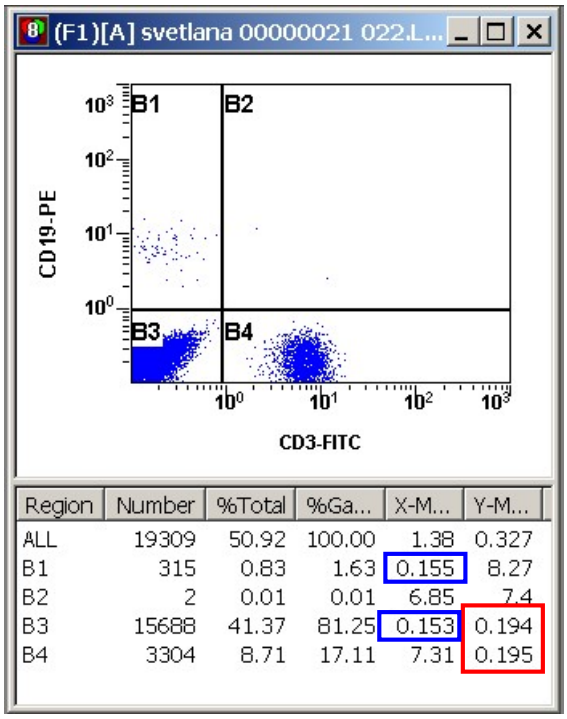
Критерием подбора нормальной компенсации является положение популяций клеток при проекции на соответствующие оси.

Сравните координаты квадрантов 3 и 4 при проекции на ось Y. Если разница более 0,02 продолжайте изменять значение компенсации до тех пор, пока координаты популяций не выровняются.

Теперь сравните координаты квадрантов 1 и 3 при проекции на ось X. Скорректируйте компенсацию, если это необходимо.



А



Б

Два важных правила, которые необходимо соблюдать при выставлении цветовой компенсации

1. Значение цветовой компенсации непосредственно связано со значениями напряжения и усиления на каналах флуоресценции, которые Вы установили на изотипическом контроле. Если Вы изменяете напряжение на каналах, то необходимо корректировать и значение цветовой компенсации.
2. При выполнении цветовой компенсации функция Baseline Offset должна быть ОТКЛЮЧЕНА.

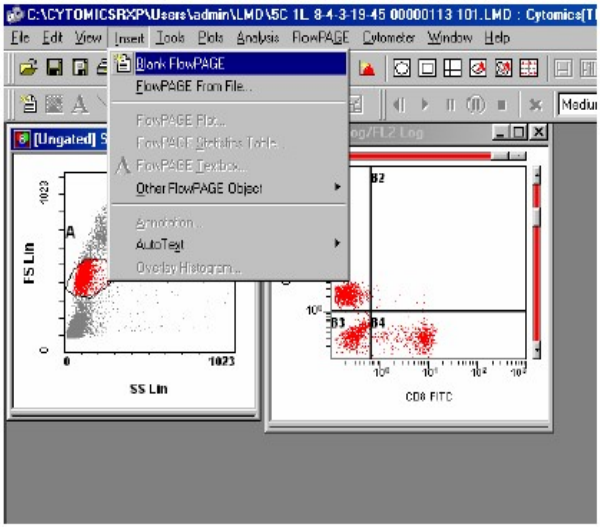
Раздел 4 – Создание FlowPAGE

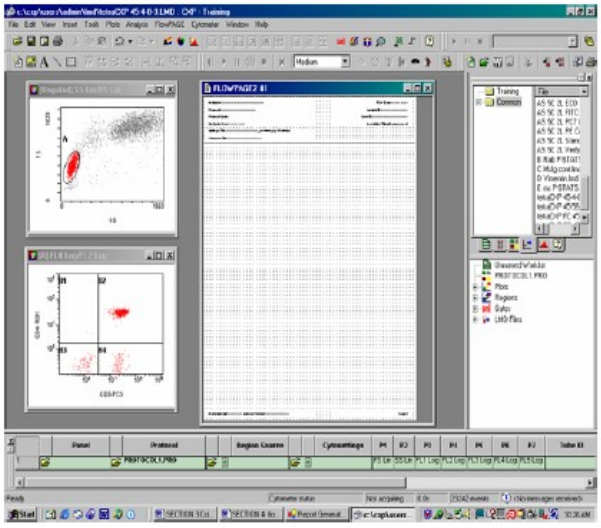
FlowPAGE позволяет составить галерею цитограмм из текущего протокола (не более 6 цитограмм на страницу).

Чтобы вставить пустую FlowPAGE в основном меню, выберите Insert -> Blank FlowPAGE или нажмите иконку .

Добавление и работа с графиками

- Чтобы переместить график или статистику на FlowPAGE поставьте курсор в центр графика и мышкой перетащите его на страничку. Повторите этот процесс для каждого графика, который Вы хотите увидеть на FlowPAGE.
- Чтобы изменить положение графика на странице, щелкните по нему мышкой, появятся ограничители картинки. Вы можете изменить размер графика или переместить его.
- Чтобы отделить гистограммы от статистик, щелкните сначала левой клавишей мыши на график, затем правой и выберите Grouping -> Ungroup.

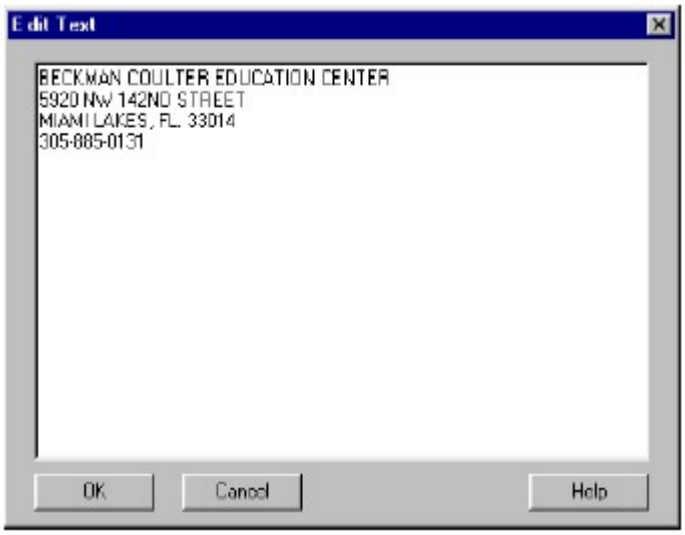




Чтобы выровнять положение графиков на странице выделите мышкой несколько графиков, затем выберите FlowPAGE -> Alignment и соответствующую опцию выравнивания. Или нажмите клавишу CTRL и, не отпуская ее, щелкните мышью на каждый график, положение которого Вы хотите выровнять.

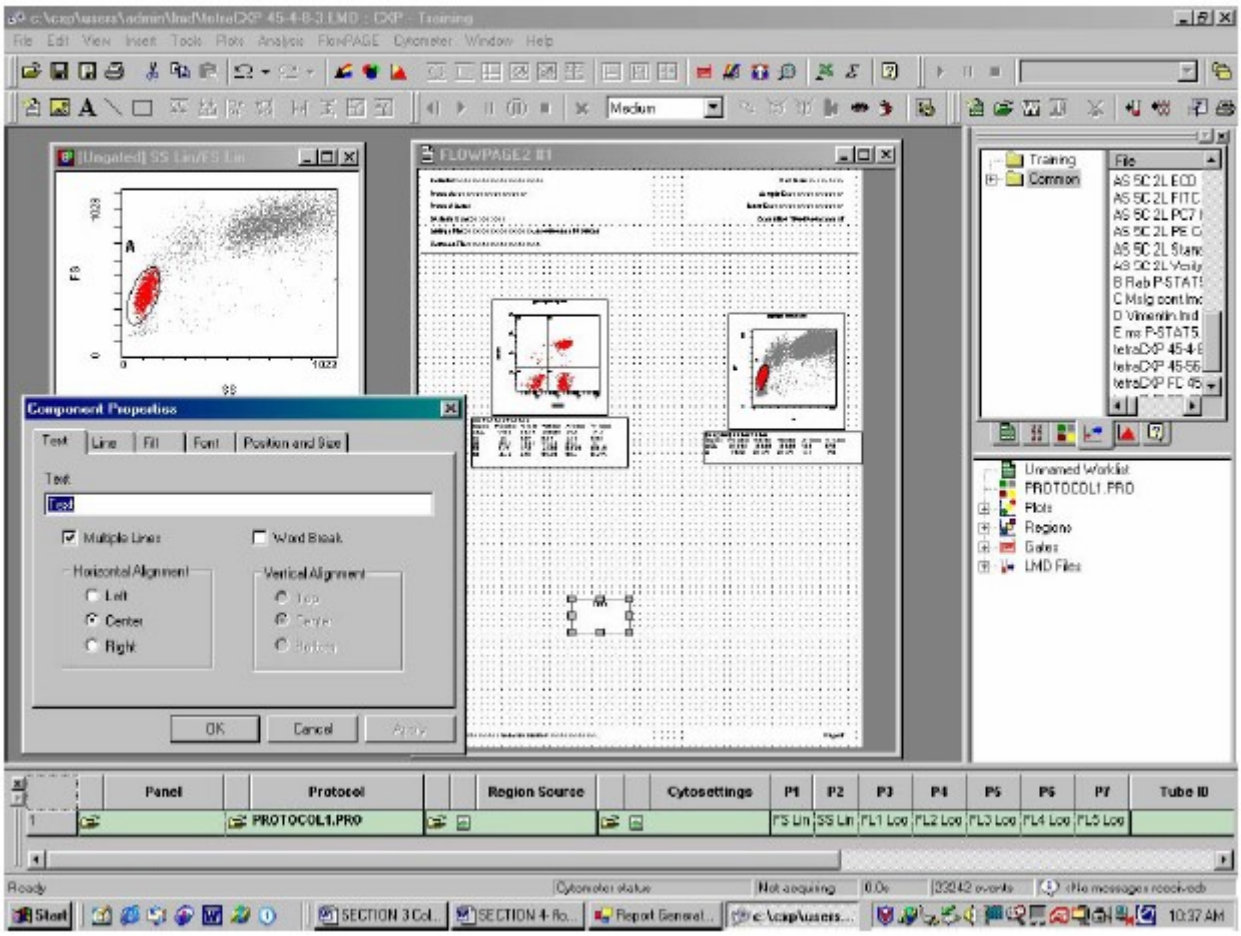
Добавление текстовой строки

- Чтобы добавить текст, выберите Insert -> FlowPAGE Textbox.
- Поместите курсор в то место странице, где предполагается разместить тест и щелкните левой клавишей мыши.
- Напишите текст в раскрывшемся окне и нажмите OK.



- Для изменения текста или шрифта щелкните правой клавишей мыши на тексте и выберите Properties.

В верхней части FlowPAGE находится фиксированный заголовок, куда автоматически записывается имя протокола, дата записи данных, имя файла данных (.LMD), идентификатор образца, имя пользователя, название организации, общее количество событий.



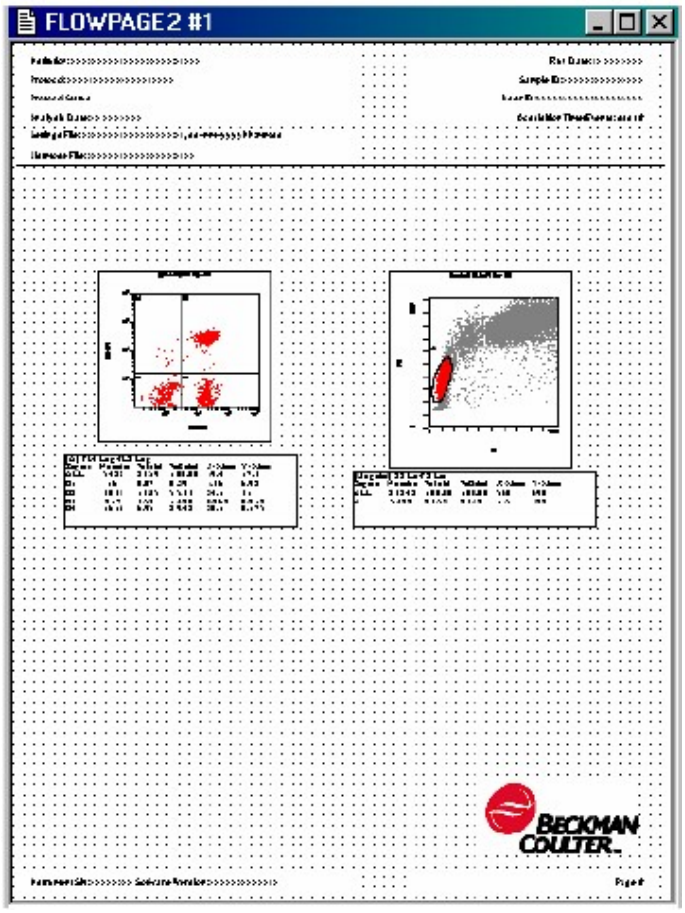
Добавление таблицы статистики

- Чтобы добавить статистику на страницу, выберите Insert -> FlowPAGE Statistics Table.
- Выберите нужные статистические параметры и нажмите OK. Таблица появится в левом верхнем углу FlowPAGE и ее можно переместить в любую другую позицию.
- Чтобы изменить шрифт в таблице статистики, щелкните на ней правой клавишей мыши и выберите Properties.

Добавление рисунка

- Выберите Insert -> Other FlowPAGE Object -> Picture.
- В открывшемся окне выберите свой рисунок, который Вы хотите вставить. В папке C:\CXP\Images также можно найти другие рисунки.
- Поместите курсор в позицию, где должен располагаться рисунок и щелкните левой клавишей мыши.
- Чтобы изменить положение рисунка на странице, щелкните по нему левой клавишей мыши, появятся ограничители картинки. Теперь Вы можете изменить размер рисунка или переместить его.

Ниже приведен пример готовой FlowPAGE.



После создания FlowPAGE не забудьте сохранить протокол, так как FlowPAGE – это часть протокола. Каждый раз, когда Вы будете запускать анализ образца в этом протоколе, графики на FlowPAGE будут обновляться.

Кроме того, FlowPAGE можно сохранять как самостоятельный объект (чтобы использовать в качестве шаблона для FlowPAGE в других приложениях). Для этого, выберите FlowPAGE -> Save FlowPAGE as… и введите имя.

Замечание: Данные Listmode, представленные на FlowPAGE **НЕ сохраняются.** Чтобы сделать FlowPAGE экспортируемой, нужно сохранять страницу в PDF формате.

Печать FlowPAGE

Чтобы напечатать FlowPAGE выберите File -> Print.

В открывшемся окне выберите, что нужно печатать (Plots, Statistics, FlowPAGE).

Альтернативный метод сохранения данных – печать в PDF формате. Для этого выберите File -> Print to PDF и отметьте, что нужно сохранять (графики, статистику и/или FlowPAGE).

Общая таблица статистики (Legend Plot)

Общая статистика позволяет суммировать информацию о %Gating, %Total, абсолютном количестве событий в каждом регионе (за исключением квадрантов). Чтобы создать общую таблицу статистики выберите Plots -> Legend. Таблицу можно поместить на FlowPAGE так же как и графики. Эта опция очень удобна, когда используется Color Blend Mode (см. далее).

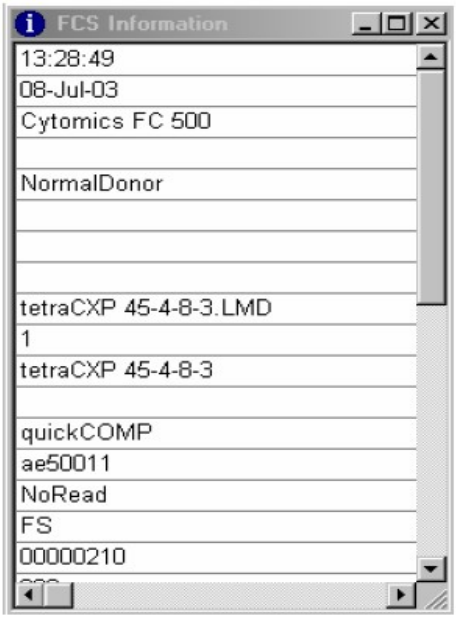
[Ungated] Legend

Color	Name	% Gated	% Total	Number	Cells/µL
	CAL	43.77	43.77	10172	1209.00
	F	20.00	20.00	4649	552.56
	E	6.89	6.89	1602	190.41
	D	13.04	13.04	3030	360.13
	C	23.57	23.57	5478	651.09
	A	23.59	23.59	5482	651.57

Окно FCS-данных

FCS – Flow Cytometry Standart – формат файлов, создаваемых при анализе на проточном цитофлуориметре.

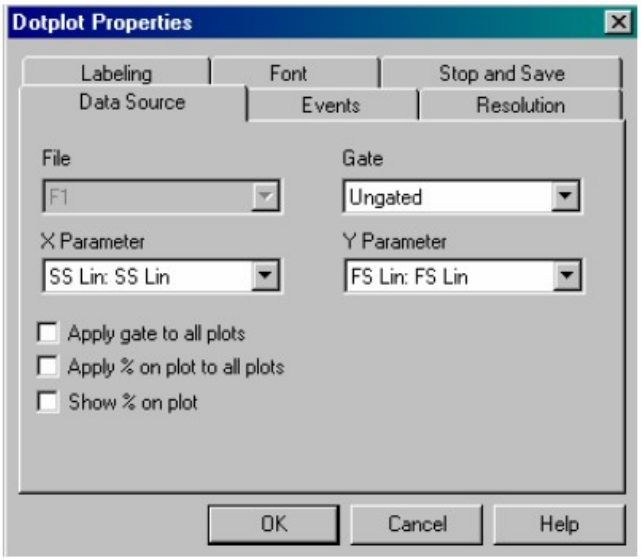
Окно FCS-данных позволяет ввести дополнительную информацию в заголовок FlowPAGE. Это может быть, например, напряжение на каналах флуоресценции, величина цветовой компенсации и т.д. Для создания окна FCS –данных выберите Plots -> FCS Information. Щелкните правой мышью на окно и выберите FCS tab и выделите поля, которые будут показаны. Нажмите OK. Перетащите окно FCS информации на FlowPAGE.


FCS Information
13:28:49
08-Jul-03
Cytomics FC 500
NormalDonor
tetraCXP 45-4-8-3.LMD
1
tetraCXP 45-4-8-3
quickCOMP
ae50011
NoRead
FS
00000210

Раздел 5 – Свойства диаграмм и регионов

Каждая диаграмма связана с окном свойств. Чтобы открыть окно свойств поместите курсор в нижний правый угол графика, дождитесь появления иконки >>> и щелкните левой клавишей мыши. Еще один способ – щелкните правой клавишей мыши на графике и выберите Format Plot в открывшемся меню. Двухпараметрической и однопараметрической диаграммам присущи различные свойства.

Окно свойств для двухпараметрической диаграммы

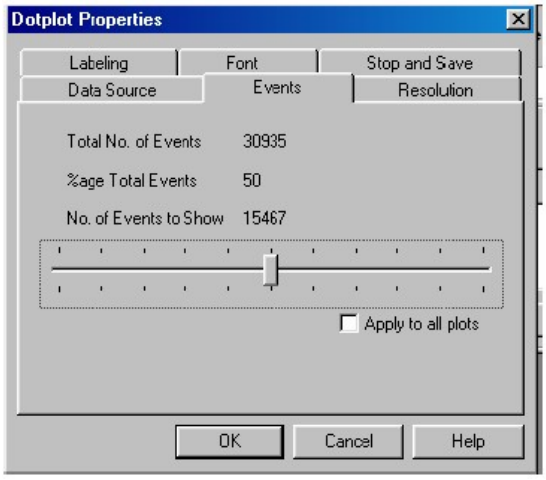


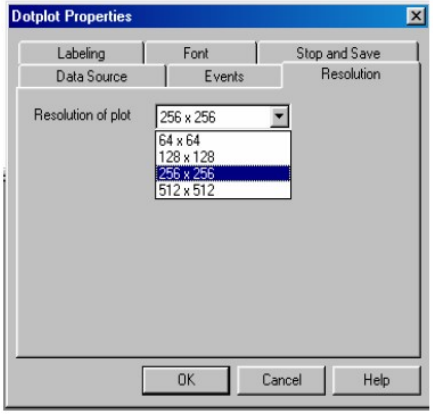
Вкладка «Источник данных « (Data Source)

В этой вкладке Вы можете выбрать анализируемые параметры (X и Y parameters), ограничить представляемые данные каким-либо гейтом (загейтировать диаграмму). Можно добавить статистические данные на поле диаграммы (результат в %). Для этого отметьте Apply % on plot to all plots и Show % on Plot. Выбор опции Apply gate to all plots гейтирует все диаграммы этого протокола, включая текущую по выбранному гейту. Опция File работает только в режиме анализа файлов данных.

Вкладка «События» (Events)

В этой вкладке есть возможность регулировать количество событий, представляемых на диаграмме. Эта опция бывает очень полезной при анализе файлов с большим количеством событий. Если устанавливается 10%, это означает, что на диаграмме будет отражаться 1, 11, 21, 31 и т.д. событие. Процент событий, устанавливаемый по умолчанию, может быть указан в меню File -> Workspace Preferences вкладка Plot Display.

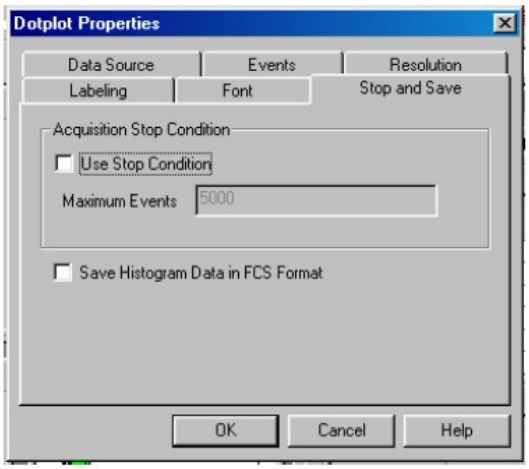




Разрешение (Resolution)

Более высокое разрешение улучшает качество графики, зато при низком разрешении обновление картинки происходит быстрее.

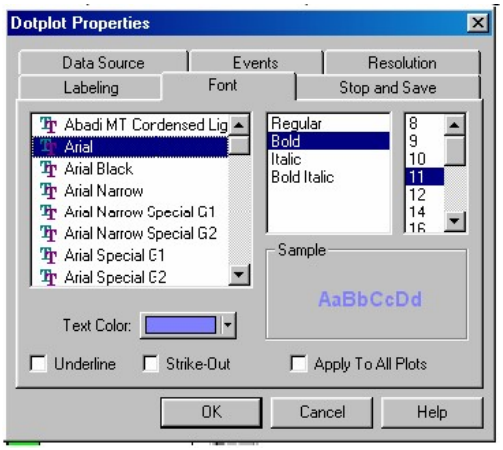
Установка условий останова и сохранения (Stop and Saves)



Условия останова позволяют установить максимальное количество событий, после накопления которых происходит автоматическая остановка сбора данных. Обычно это условие применяют для гейтированных диаграмм, тем самым определяя, какое количество клеток из конкретной популяции необходимо собрать.
Замечание: Это условие останова отменяет ранее установленные в окне Cytometer Control.

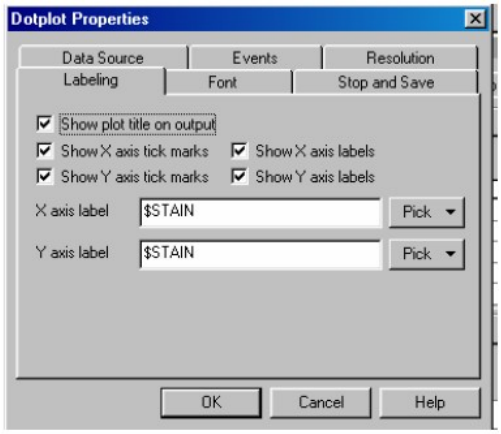
Сохранение данных гистограммы в формате FCS позволяет сохранить текущую гистограмму для последующего анализа в программе CXP Analysis.
Замечание: Чтобы сохранить файл гистограммы, нужно также установить опцию сохранения гистограмм в меню File -> Workspace Preferences, вкладка Acquisition Option.

Шрифт (Font)



В этой вкладке можно изменить тип, размер, стиль, цвет шрифта, установить подчеркивание (Underline), зачеркивание (Strike-out) текста для текущей диаграммы или для всех диаграмм (выбрав опцию Apply to all plots).

Подписи осей (Labeling)

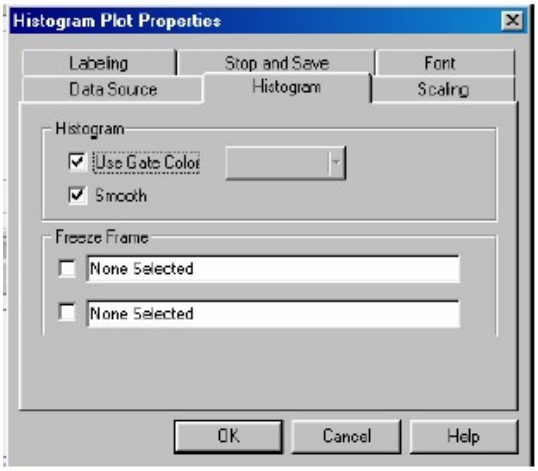


В этой вкладке можно изменить подписи осей для текущей диаграммы или отменить их вывод на экран, добавить или отменить вывод названия диаграммы, изменить вывод делений на осях.

Окно свойств для однопараметрической диаграммы

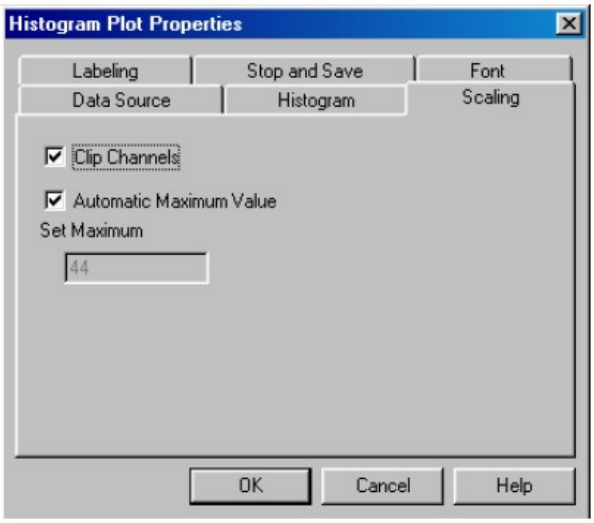
Четыре вкладки в этом окне полностью совпадают с таковыми из окна для двухпараметрической, поэтому далее будут рассмотрены вкладки, характерные для свойств только однопараметрических диаграмм.

Гистограмма (Histogram)



Если отмечено Use Gate Color, гистограмма будет окрашиваться в установленный по умолчанию цвет. Чтобы изменить цвет, отмените метку у Use Color Gate, тем самым Вы активируете кнопку выбора цвета. Выберите новый цвет.

Если отмечено Smooth, то данные гистограммы будут проведены через сглаживающий алгоритм и вид гистограммы несколько изменится.



Scaling

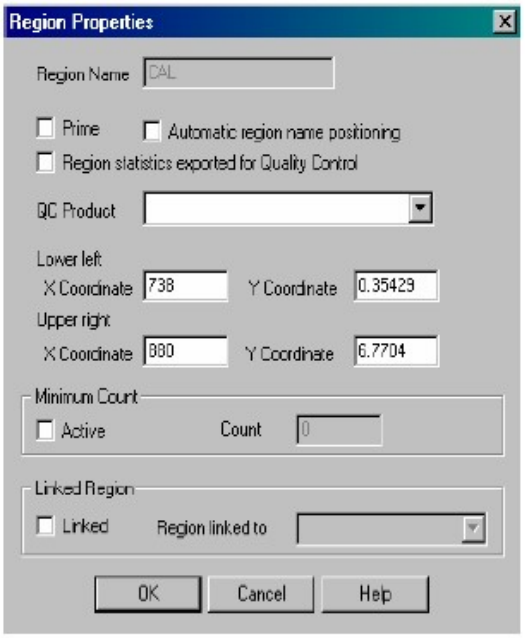
Автоматическая разметка шкалы (Automatic Maximum Value) подбирает максимальную метку на шкале таким образом, чтобы пик занимал всю высоту шкалы и не выходил за ее пределы.

Переключение Clip Channels при включенном Automatic Maximum Value обеспечивает исключение из анализа минимальных и максимальных значений каналов.

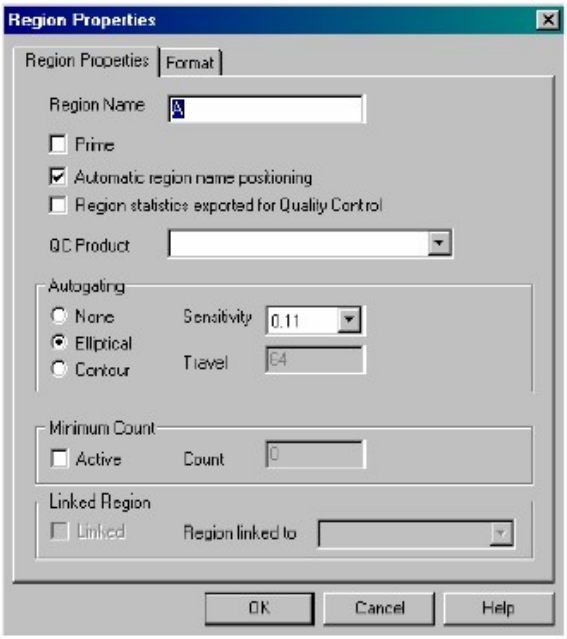
Окно свойств регионов

Чтобы открыть окно свойств переместите указатель мыши на контур региона и дождитесь появления крестовой стрелки, щелкните левой клавишей мыши, появятся ограничители региона. Пока не исчезла крестовая стрелка, нажмите правую клавишу мыши и выберите Region Properties. Вид раскрывшегося окна будет зависеть от типа региона:

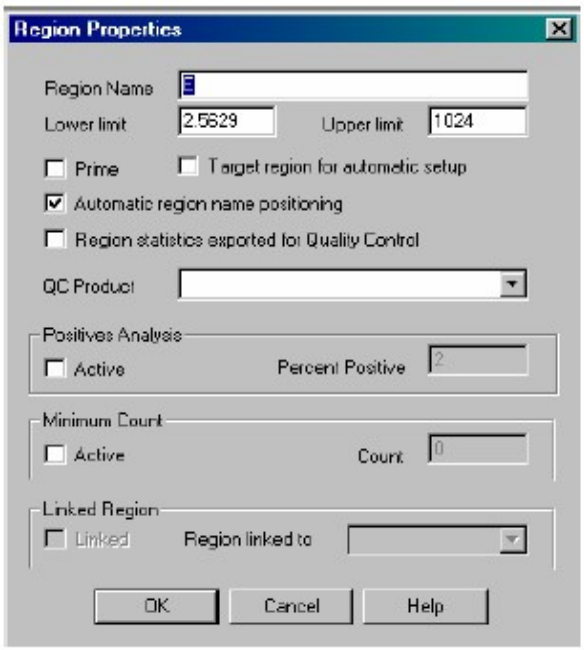
Прямоугольный регион



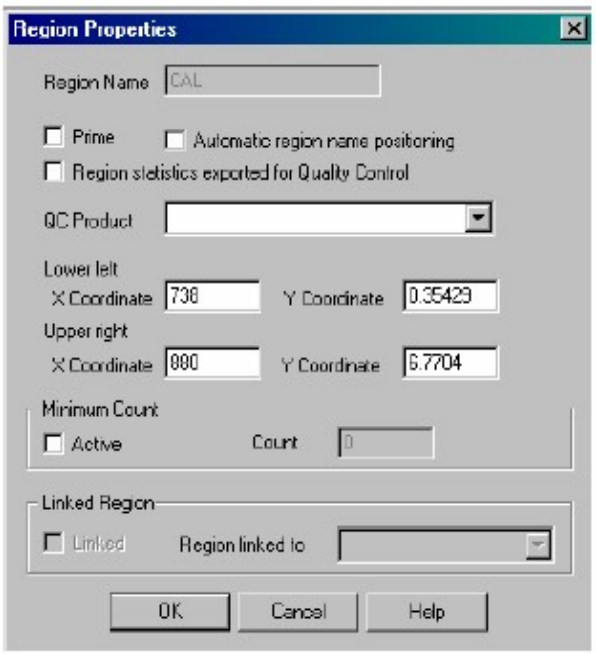
Полигональный, эллипсоидный и контурный регионы



Линейный регион



Квадрантный регион



Prime regions – регион такого свойства контролирует ту область диаграммы, где ожидаются события. Если в процессе забора пробы событий там не появляется, например, вследствие загрязнения проточной ячейки или обтурации пузырьками воздуха, цитометр автоматически инициирует функцию Prime cycle. Производится три цикла Prime, если картина данных не изменяется, анализ пробы прекращается.

Minimum Event Region – эта опция отменяет существующее условие останова по количеству событий и устанавливает новое условие по минимальному количеству событий, попадающих в конкретный регион. Это условие ограничивается временем

остановки и максимальным количеством событий, установленным в окне Cytometer Control.

Positives Analysis – эта опция передвигает регион таким образом, чтобы события внутри и за его пределами распределялись указанным образом (в % от 0.1 до 99.9). Использование этой опции автоматически устанавливает регион по негативному контролю.

Region Name - имя региона.

Lower Limit and Upper Limit – установка региона определяется некоторыми ограничениями. Эти ограничения можно посмотреть в меню Analysis -> Select Result -> Min/Max.

Target Region for Automatic Setup – устанавливает регион как регион частиц Flow-Set для автонастройки, когда на диаграмме по FS представлено много регионов.

Automatic Region Name Positioning – положение названия региона устанавливается автоматически. Вы можете переместить название в любое место графика.

Linked Regions – регионы разных графиков могут быть связаны между собой. Регионы могут быть связаны, если они одного типа (т.е. линейный с линейным, полигональный с полигональным и т.д.) или один из них прямоугольный, а другой квадрантный.

Region Statistics Exported to Quality Control (работает в комбинации с окном продуктов контроля качества). Используется, если регион анализирует один из продуктов контроля качества и экспортирует результаты в QC-файл.

Свойства, специфичные для полигональных регионов

None – кнопка включается, когда не используется функция автогейтирования.

Elliptical – автозахват осуществляется в эллипсоидный регион.

Contour - автозахват осуществляется в контурный регион.

Sensitivity – настройки для эллипсоидного автогейта – 0,11, 0,33 и 1,1 (% от обрабатываемого пика). Для контурного автогейта – 1, 2, 3, 4 и 5. Уровень 1 соответствует 0,11% высоты обрабатываемого пика при разрешении 64x64, уровни 2, 3 и 4 – 0,11, 0,33 и 1,1% при разрешении 128x128. Уровень 5 – 1.1% пика при разрешении 256x256. При выборе 0,11 создается регион с наибольшим радиусом, при 1,1 – с наименьшим радиусом.

Travel – позволяет указать в пределах каких значений может изменятся Mean контурного автогейта от пробирки к пробирке. Минимальное значение, которое можно указать – 25, максимальное – 250. Эту опцию используют для подстройки автогейтирования в разных пробах, если небольшие изменения лизиса приводят к смещению исследуемой популяции. Эта опция не работает для эллипсоидного автогейта.

Раздел 6 –Acquisition Manager (Управление сбором данных)

Acquisition Manager используют для составления рабочего списка образцов, которые Вы собираетесь анализировать. Протоколы и панели можно перетащить мышкой из Resource Explorer в Acquisition Manager или открыть, нажав на иконку .



Панель инструментов Acquisition Manager выглядит следующим образом:



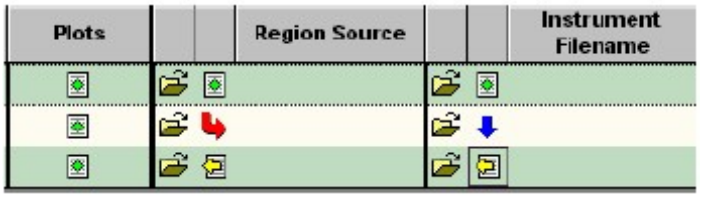
Acquisition Manager можно использовать для анализа образцов и в режиме Single Tube Mode и MCL Automatic и MCL Manual Mode.

Acquisition Manager columns

Panel – Эта колонка содержит список всех панелей, которые были загружены в Acquisition Manager.

Protocol - Эта колонка содержит список всех протоколов, которые были загружены в Acquisition Manager.

Plots, Region Source, Instrument Filename – Символы в этих колонках указывают как графики, регионы и настройки протоколов будут передаваться от одной строки Acquisition Manager к другой. Существует 3 возможности:



 - означает, что графики, гейты, регионы и настройки будут использоваться из текущего протокола.

 - передает положение регионов и настройки предыдущего протокола, а настройки текущего протокола игнорируются.

 - передает положение регионов первого протокола рабочего списка.

Это очень удобно при анализе в панелях, когда положение регионов и настройки устанавливаются на контрольном образце, а затем используются для последующих.

 - означает, что положение регионов и настройки загружены из другого файла.

Parameters – В колонках, обозначенных как P1, P2, P3 и т.д. указаны параметры, выбранные для анализа в данном протоколе, т.е. FS, SS, FL1 и т.д. Эти колонки можно использовать для обозначения осей графиков в конкретном протоколе. Подписи осей будут обновляться на графиках при запуске анализа образца. Если активировать функцию Save Protocol в Workspace Preferences -> Acquisition Option tab, то названия осей будут автоматически сохраняться в протокол.

Tube ID - колонка предназначена для введения штрих-кода пробирки. Информация считывается с помощью сканера карусели, если считывания не происходит, в колонке появляется сообщение об ошибке.

Carousel and Location – в колонке указывают номер карусели и позиции. Изменяя номер позиции Вы можете анализировать пробы в произвольном порядке.

Sample ID – идентификатор образца. Можно использовать до 4-х идентификаторов для обозначения образца (Sample ID1, Sample ID2 и т.д.). Как изменять количество идентификаторов смотрите ниже в Customize Worklist Columns.

LMD filename – указывает имя, которое присваивается файлу, создаваемому в результате анализа образа. Чтобы Sample ID автоматически присоединялся к имени файла нужно указать это в Workspace Preferences -> LMD filename tab.

Stop Condition and Stop Value – в колонке можно указать новые условия остановки анализа в данном протоколе (время и количество событий). При этом старые установки отменяются.

Customize Worklist Columns – изменение перечня колонок рабочего списка. Чтобы открыть эту опцию щелкните правой клавишей мыши на заголовках колонки или



нажмите иконку  в панели инструментов Acquisition Manager.

В открывшемся окне можно выбрать нужные названия колонок или переименовать их. Чтобы присвоить новое имя колонке, щелкните левой клавишей мыши на имени, затем напишите новое. Также можно изменить порядок колонок путем перетаскивания их на нужное место непосредственно в Acquisition Manager.

Если Вы постоянно анализируете одну и ту же группу образцов, то можно сохранить рабочий список, нажав иконку  в панели инструментов. Чтобы загрузить сохраненный рабочий список, нажмите . Для очистки рабочего списка нажмите иконку .

Раздел 7 – Создание панелей

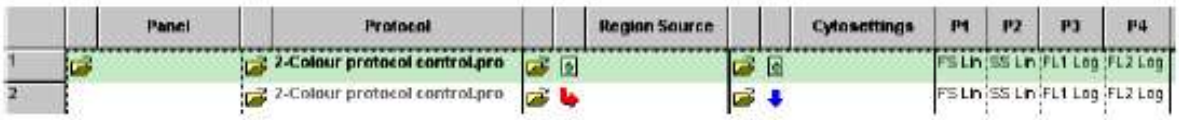
Панель представляет собой список протоколов. Однако в обычном списке протоколы работают независимо друг от друга и изменения в одном из них не отражаются на других. Панель позволяет переносить информацию (положение регионов, настройки и др.) из одного протокола в другой. Это очень удобно, когда среди образцов есть контрольная проба, по которой выставляется положение регионов, компенсация, усиления на каналах. Использование панелей позволяет перенести все эти параметры на все последующие опытные пробирки.
Прежде чем приступить к созданию панели убедитесь, что Ваш базовый протокол настроен и содержит все необходимые регионы.
Если Вы планируете анализ в разных протоколах (с различным набором графиков), то необходимо предварительно создать их. Если протоколы для различных образцов не отличаются, Вам будет достаточно одного протокола.
Если в первом протоколе панели (для контрольной пробы) используется автогейтинг и позитивный анализ, то в последующих протоколах эти опции должны быть инактивированы. Т.е. нужно создать 2 протокола – с активными автогейтингом и позитивным анализом и без них.

Метод 1 – Создание панели с помощью Acquisition Manager

- Очистите рабочий список, нажав .
- Перетащите Ваш контрольный протокол из Resource Explorer в Acquisition Manager.



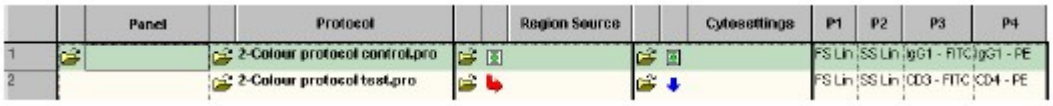
- Нажмите иконку Insert Test , чтобы продублировать первую строку Acquisition Manager.



- Нажмите иконку во второй строке колонки Protocol и выберите свой тестовый протокол (если все протоколы в панели планируются одинаковыми, то этого делать не нужно). Далее Вы можете продублировать этот протокол с помощью иконки Insert Test столько раз, сколько необходимо.



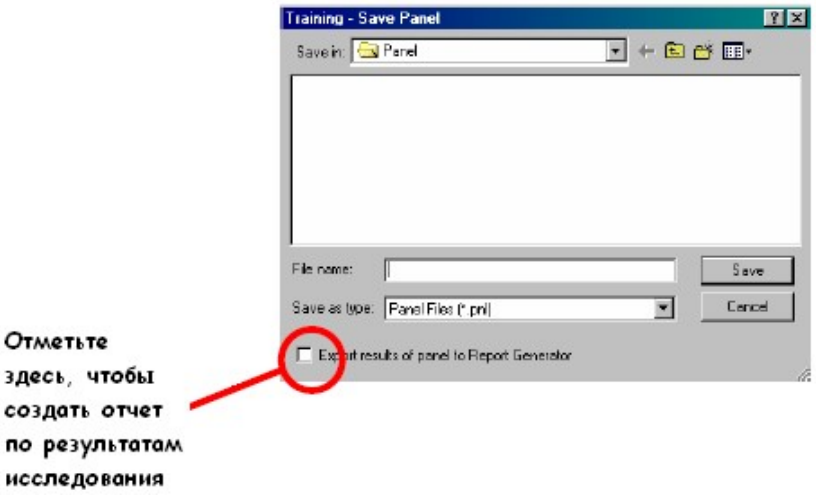
- Введите соответствующие имена параметров в колонки P1, P2, P3 и P4 для контрольного и тестовых протоколов.



- Щелкните правой клавишей мыши в колонке Panel и выберите «Save as Panel», чтобы сохранить панель.

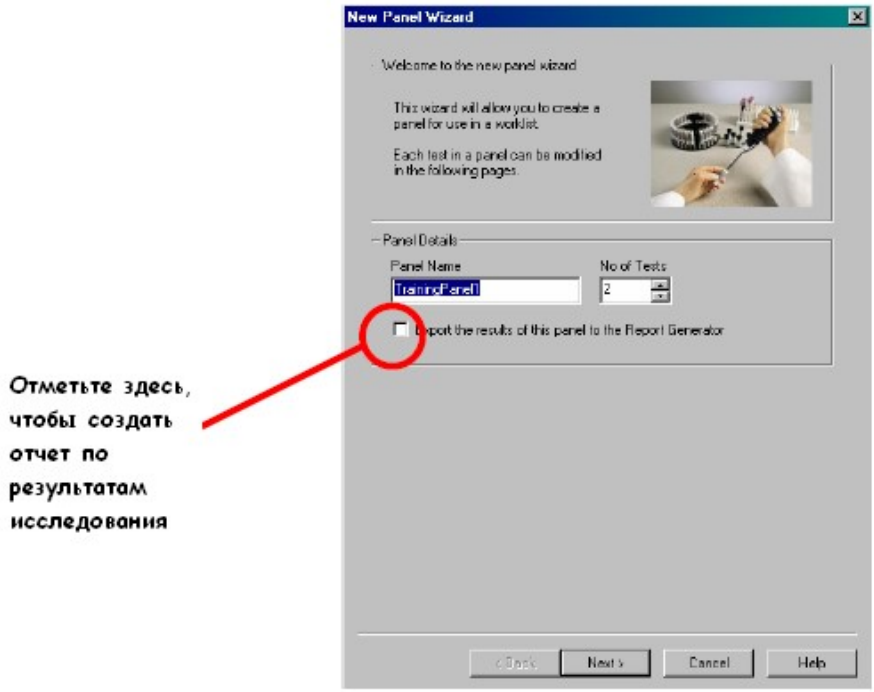


- Отметьте щелчком мыши *Export results of panel to Report Generator* и присвойте имя сохраняемой панели.



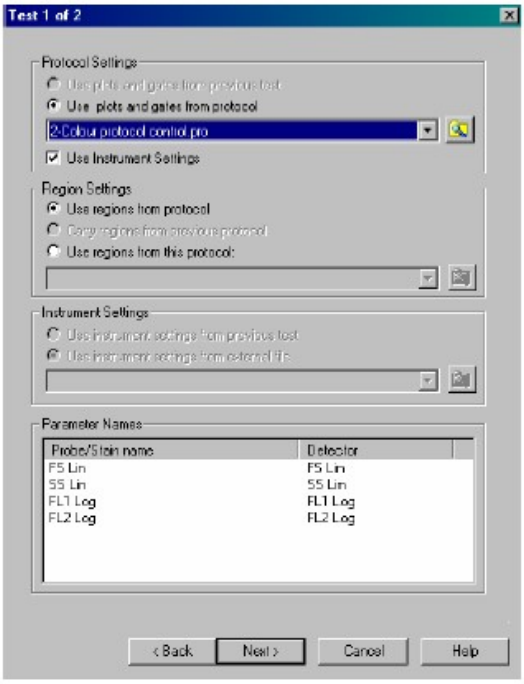
Метод 2 – Создание панели с помощью Мастера создания панелей (New Panel Wizard)

- Выберите File -> New Panel. Отметьте *Export results of panel to Report Generator.*

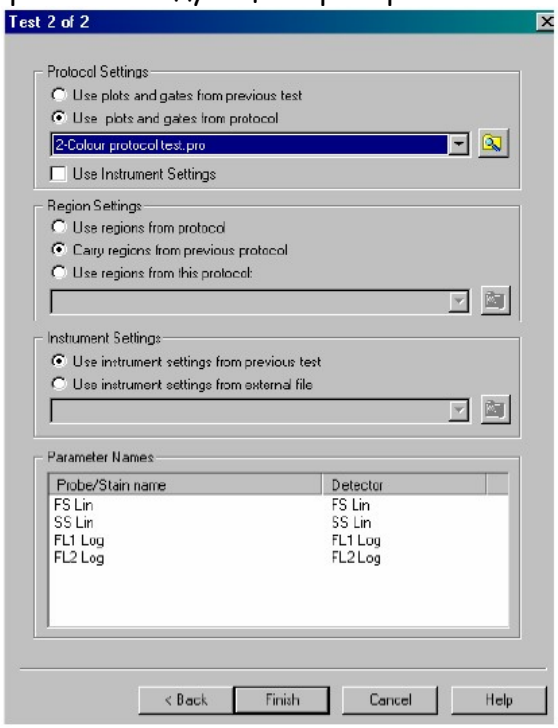


- Введите имя панели и количество тестов в панели. Нажмите Next.

- На второй странице нужно обозначить некоторые детали работы 1-й пробирки в панели.



Protocol Settings – позволяет выбрать протокол, в настройках которого будет проводиться анализ всех образцов панели. Отметьте Use Instrument Settings.
Region Settings – положение региона может быть использовано из текущего протокола (Use regions from protocol) или импортироваться из другого (Use regions from this protocol).
Instrument Settings – это поле будет неактивно, если Вы выбрали «Use Instrument Settings», т.е. используете настройки, сохраненные вместе с протоколом.
Parameter Names – введите имена параметров, которые Вы собираетесь анализировать в этой пробе.
Нажмите Next, чтобы перейти к следующей пробирке.



Protocol Settings – Выберите свой второй протокол, но не отмечайте Use Instrument Settings, если Вы хотите чтобы на данную пробу передавались настройки из предыдущего теста.

Region Settings – чтобы сохранить положение регионов как в предыдущем тесте отметьте «Carry regions from previous protocol» (переносить регионы из предыдущего протокола). «Use region from protocol» означает, что положение регионов определяется настройками текущего протокола, «Use region from this protocol» позволяет импортировать положение регионов из другого протокола.

Instrument Settings – в этом разделе нужно указать источник настроек прибора. Если Вы хотите использовать настройки из предыдущего протокола, отметьте «Use instrument settings from previous protocol». В противном случае, укажите, из какого протокола будут импортироваться настройки «Use instrument settings from external protocol».

Parameter Names – введите имена параметров, которые Вы собираетесь анализировать в этой пробе.

Нажмите Next для ввода следующего теста или Finish, если это последний тест панели. После нажатия Finish панель будет создана и сохранена на диск.

Раздел 8 – Отчеты по панелям и база данных

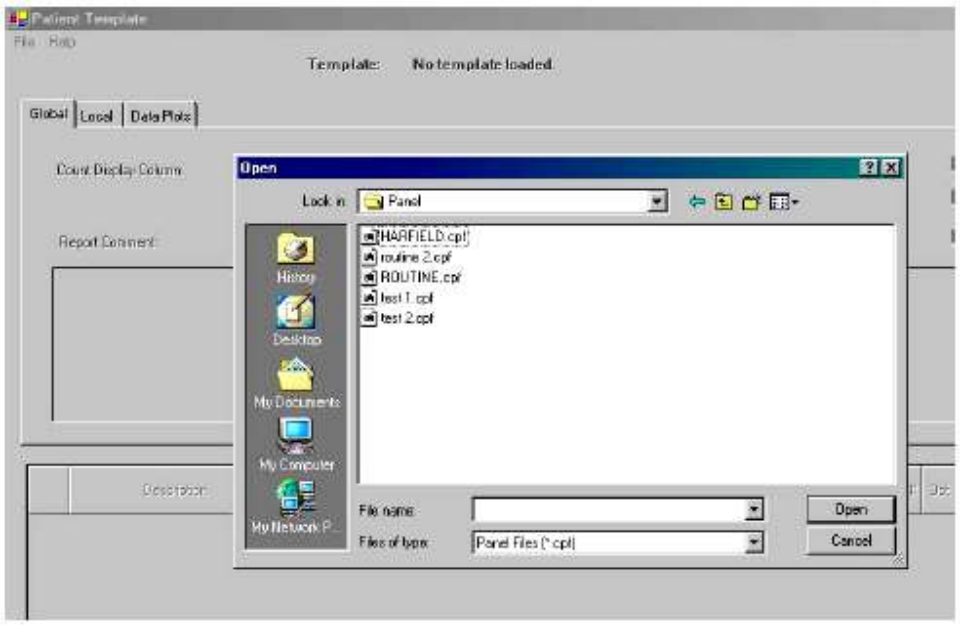
Отчет по панели позволяет суммировать и распечатать данные, полученные при анализе в панели. Кроме того, в отчет можно включать до 16 графиков, производить расчет абсолютного количества клеток как с использованием FlowCount, так и по данным гематологического исследования.

Создание отчета по панели

- Разверните панель инструментов Report Generator (Генератор отчета), которая расположена внизу экрана.



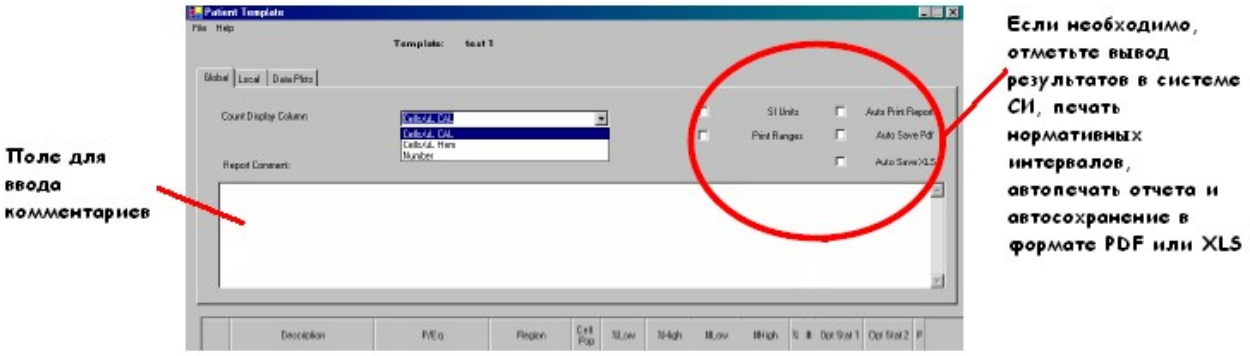
- Выберите иконку Panel Template (Шаблон отчета).
- В открывшемся окне Patient Template выберите File -> Open. Откроется следующее окно:



Все файлы шаблонов отчета имеют расширение .cpf, а имя соответствует имени панели. Поэтому выберите имя созданной Вами панели и нажмите Open.
Откроется шаблон отчета для этой панели. В окне Вы увидите 3 вкладки: Global, Local и Data Plots.

Вкладка «Global»

В этом окне Вы можете отметить общие параметры шаблона, которые будут применяться ко всему отчету.



Комментарии, размещенные в этом окне, будут отражаться во BCEX отчетах по панели. Если Вы используете Flow-Count для подсчета абсолютного количества клеток, выберите «Cells/µl CAL». При использовании данных гематологии выберите «Cells/µl Hem». Результат будет выдаваться в кл/мкл (если не отмечено «SI Units»). Если абсолютные значения не требуются, выберите «Number».

Вкладка «Local»

В этом окне Вы выбираете, какие результаты будут выводиться на печать.



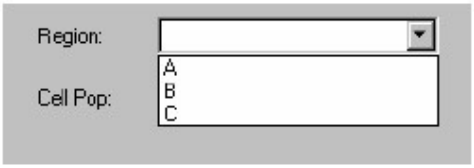
- Поле «Description» (описание) позволяет описать представляемый результат, например «CD3+ лимфоциты ».



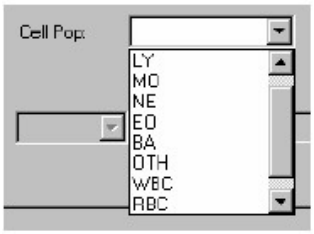
- В поле «Protocol» нужно указать, из какого протокола будет выбираться результат в этой строке, т.е. нужно выбрать протокол, в котором происходит анализ CD3-позитивных клеток. Если у Вас используется один и тот же протокол несколько раз, просто отсчитайте номер нужного протокола и выберите его.



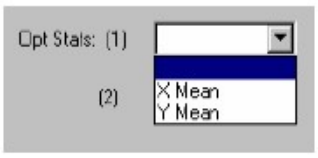
- В строке «Region» отражаются все регионы из выбранного протокола. Выберите регион, статистика которого является результатом в данной строке (т.е. соответствует результату CD3-позитивных клеток).



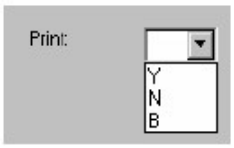
- Если Вы отметили Cells/µl Hem во вкладке «Global», то выберите клеточную популяцию, для которой будет производиться расчет абсолютных значений, т.е. для CD3 это лимфоциты - LY.



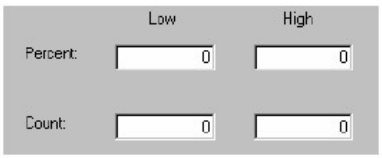
- Шаблон автоматически представляет результат в % или в абсолютных значениях, если требуется. Но также есть возможность вывести другие статистические параметры в поле Opt Stats. Выводимые данные статистики зависят от выбранных в протоколе (Раздел 2 – Создание протокола, шаг 7).



- В поле «Print» нужно указать будет печататься эта строка («Y») или нет («N»), либо можно выбрать вставку пустой строки («B»).



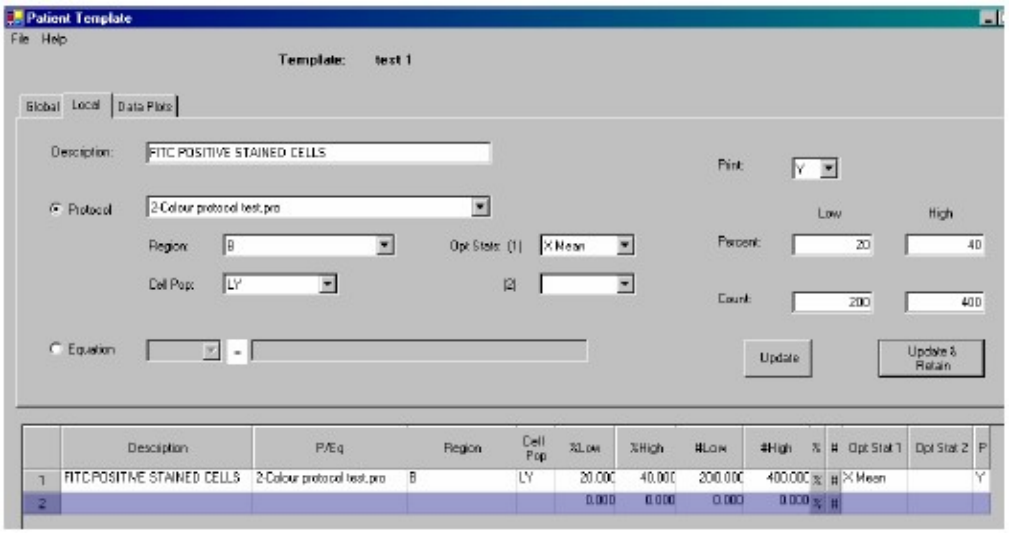
- Строки «Percent» и «Count» предназначены для ввода границ нормативных интервалов (нижней – Low и верхней – High). Этот интервал будет распечатываться в отчете, если во вкладке «Global» было отмечено «Print Ranges».



- Нажмите «Update» или «Update & Retain», чтобы сделанные записи появились в нижней половине шаблона.



В результате получается следующая картина:



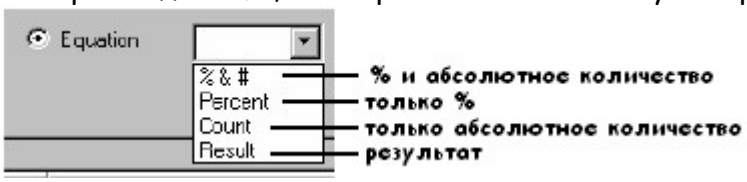
Ввод выражений

Кроме того, что в отчет включаются результаты из определенных регионов, Вы можете выполнять простые арифметические действия с результатами из разных строк. Например, Вам необходимо вычислить среднее значение CD3+ клеток из разных образцов. Для этого нужно сложить результаты двух строк и разделить на 2.

Отметьте опцию «Equation» (Выражение).

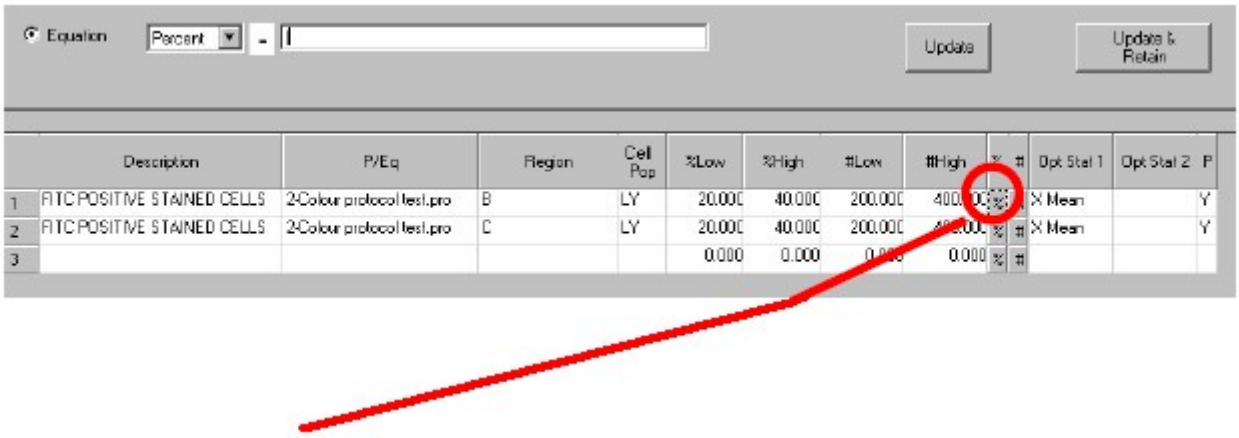


В первом окошке выберите единицы, в которых Вы хотите получить результат:



В нашем примере чтобы получить среднее значение CD3+ клеток в %, нужно выбрать вывод результата в %, сложить значения из строк 1 и 2 и разделить на 2.

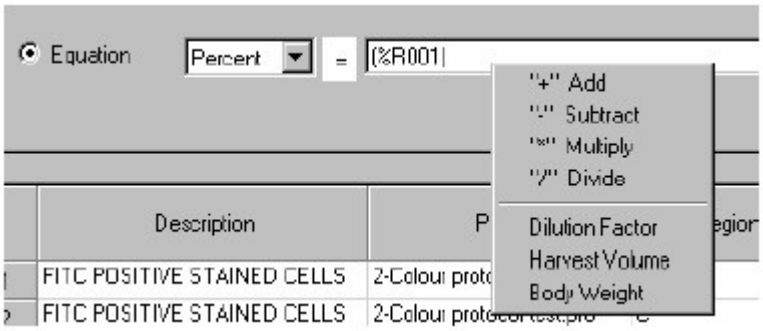
- Во-первых, откройте круглую скобку (***все номера строк должны быть заключены в скобки***).



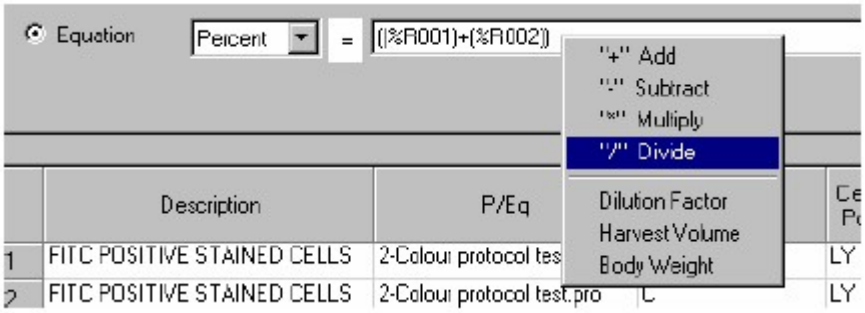
- Нажмите на иконку «%» в первой строке – появится знак % после скобки. Можно также ввести этот знак с клавиатуры.
- Введите номер строки: напишите заглавную букву R (от англ. Row – строка), затем номер (в данном случае R001). Нумерация строк от (R001) до (R100).
- Закройте скобку.

Замечание: если Вам нужно получить абсолютные значения, то в типе результата выражения нужно выбрать «#» и при вводе номера строки также нажать «#» в соответствующей строке. Если требуются и абсолютные и относительные значения («% & #» в типе результата выражения), то подойдет любая иконка в номере строки (% или #).

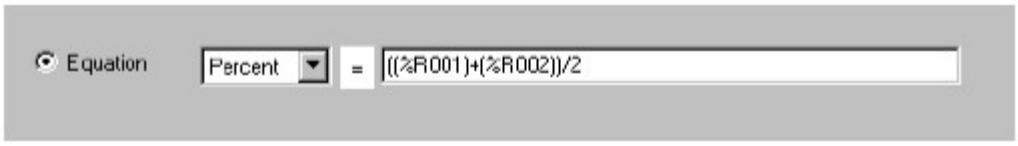
- Введите знак арифметического действия либо с клавиатуры компьютера, либо нажав в строке правой клавишей мыши и выбрав нужный знак.



- Теперь снова откройте скобки и введите следующий номер строки таким же образом, в данном примере (%R002).
- Заключите все выражение в скобки и введите знак деления.

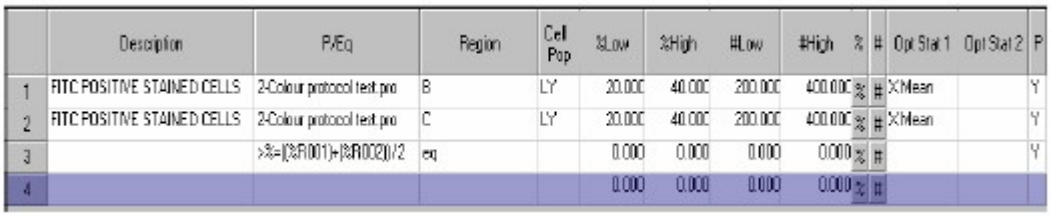


- Напишите цифру «2» после знака деления.



Нажмите «Update».

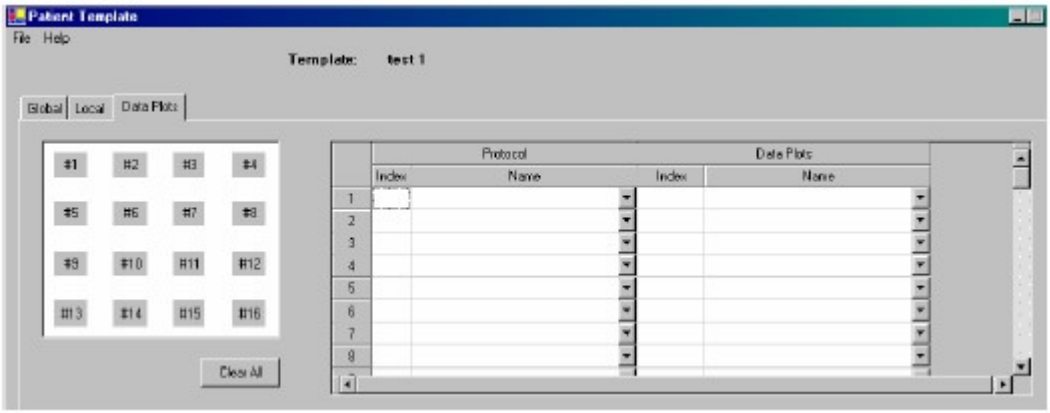
В данном примере должно получиться следующее:



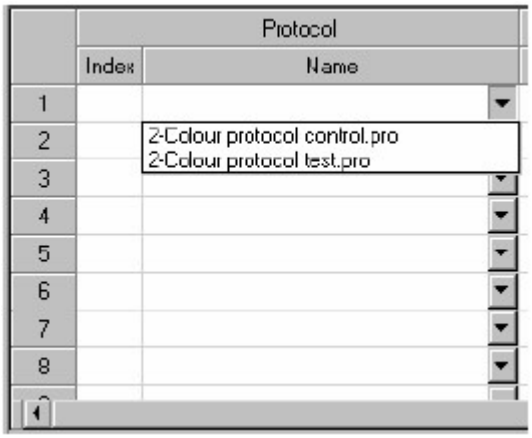
Выберите File -> Save чтобы сохранить полученный шаблон.

Вкладка Data Plots

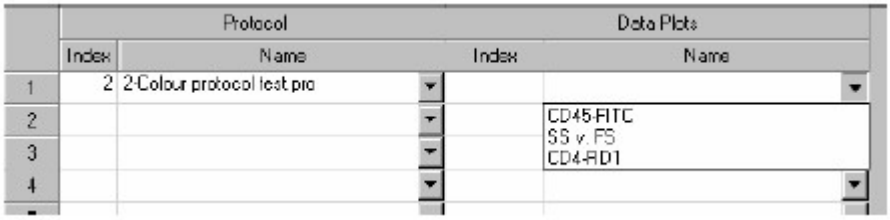
В этой вкладке Вы можете добавить в отчет до 16 графиков.



В колонке Protocol нажмите на кнопку  и выберите протокол, график из которого Вы хотите включить в отчет.



В колонке Data Plots таким же образом выберите конкретный график, ориентируясь на названия осей.



Сохраните шаблон File -> Save.

Сверяйте результаты, формируемые шаблоном отчета панели с результатами, получаемыми непосредственно из протокола при анализе образца.

База данных пациентов (Patient Database)

База данных позволяет водить и хранить важную информацию по каждому пациенту. Только небольшая часть этих данных будет использоваться в отчете, но эта информацию можно перенести с FC500 во внешние базы. Важнейшей особенностью базы данных является возможность ввода данных гематологического исследования для использования в подсчете абсолютного количества клеток по двухплатформенной технологии. Эту информацию нужно вводить перед анализом образца, в противном случае отчет будет сформирован без учета данных гематологии. Однако, если на момент анализа результатов гематологического исследования еще нет, можно ввести их позже и воспроизвести записанные файлы. В результате будет сформирован новый полный отчет. Каким образом это сделать будет рассмотрено позже (см. работу в приложении CXP-analysis).

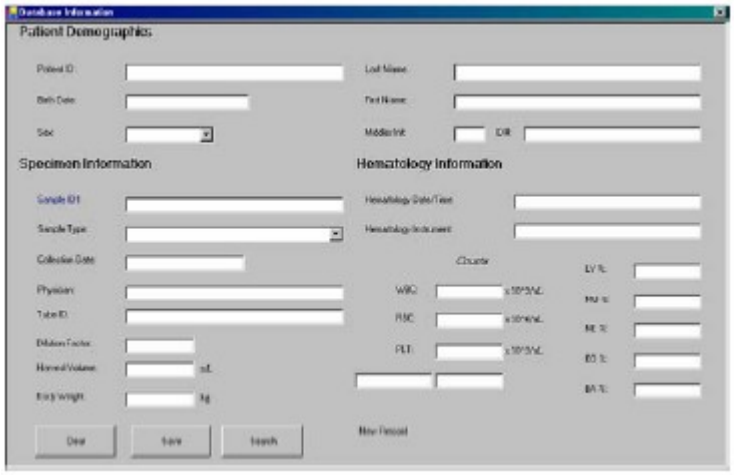
«Sample ID1» - самый важный идентификатор пациента и соответствующее поле в данных о пациенте должно быть обязательно заполнено. Идентификатор Sample ID1 в базе данных должен ТОЧНО соответствовать Sample ID1, вводимому в Acquisition Manager при анализе образца. Sample ID1 также должен быть ИНДИВИДУАЛЬНЫМ для каждого пациента.

Ввод информации о пациенте в Базу данных

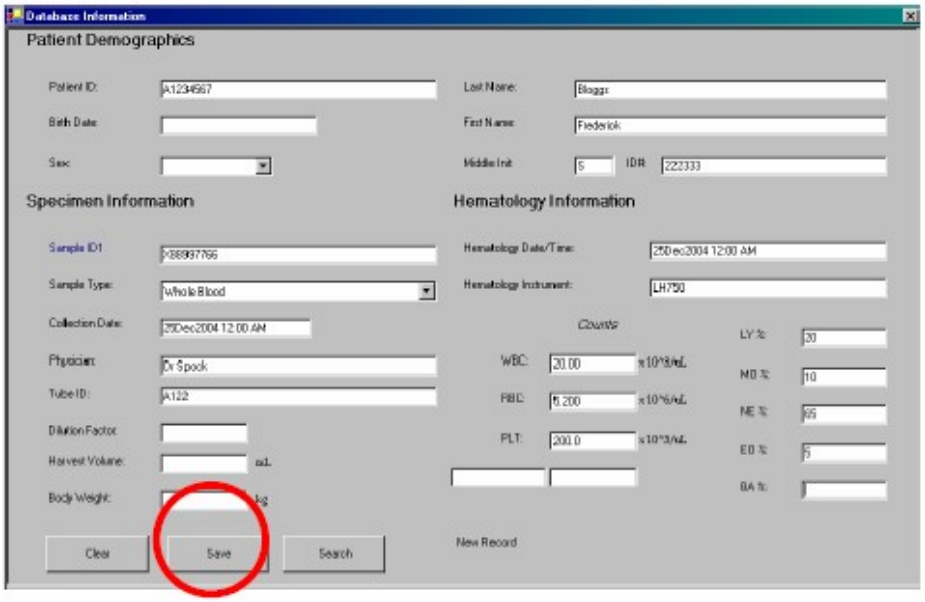
Разверните панель генератора отчетов Report Generator и выберите иконку Database Entry.



Откроется окно информации:



Обязательно введите Sample ID1 и по необходимости остальную информацию. Нажмите кнопку Save.

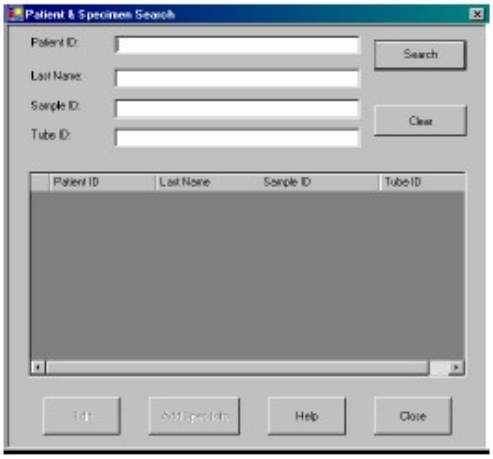


Поиск в базе данных

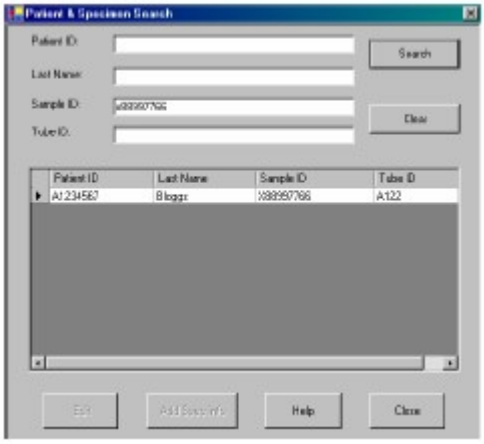
Чтобы найти ранее сохраненную информацию о пациенте нажмите кнопку Search.



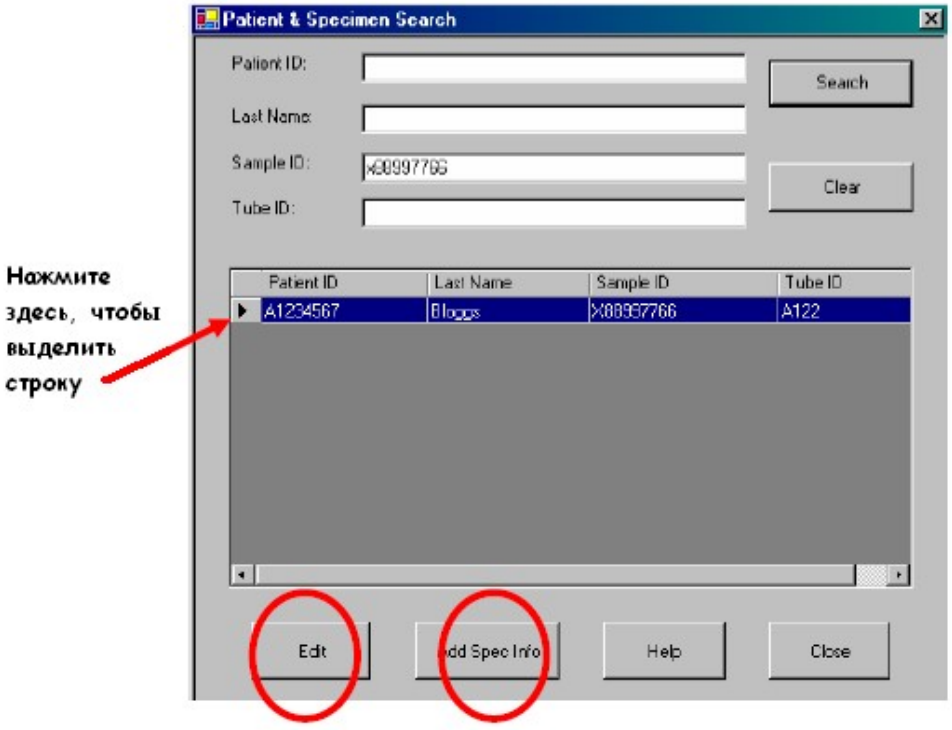
Откроется окно поиска.



• Введите информацию для поиска. Это может быть Sample ID1, фамилия (Last Name), идентификатор пациента (Patient ID) и т.д. Появится список записей, соответствующих введенным критериям.



• Щелкните мышью на строку, которую Вы хотите изменить и нажмите кнопку Edit (редактировать) или Add Spec Info (добавить информацию).



- Выбор режима Edit позволяет изменять все поля записи, за исключением Sample ID1.
- В режиме Add Spec Info можно изменять все поля записи.
- Измените необходимую информацию и нажмите Save.

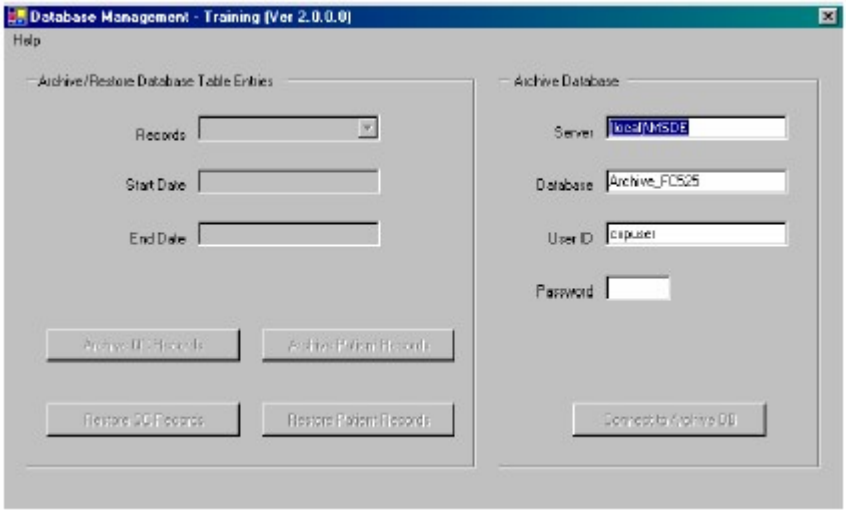
Управление базой данных

Отчеты контролей качества и пациентов хранятся в базе данных. Однако по прошествии времени база может стать слишком большой и потребуется заархивировать часть старых записей.

Нажмите иконку Database Management в панели инструментов генератора отчетов.

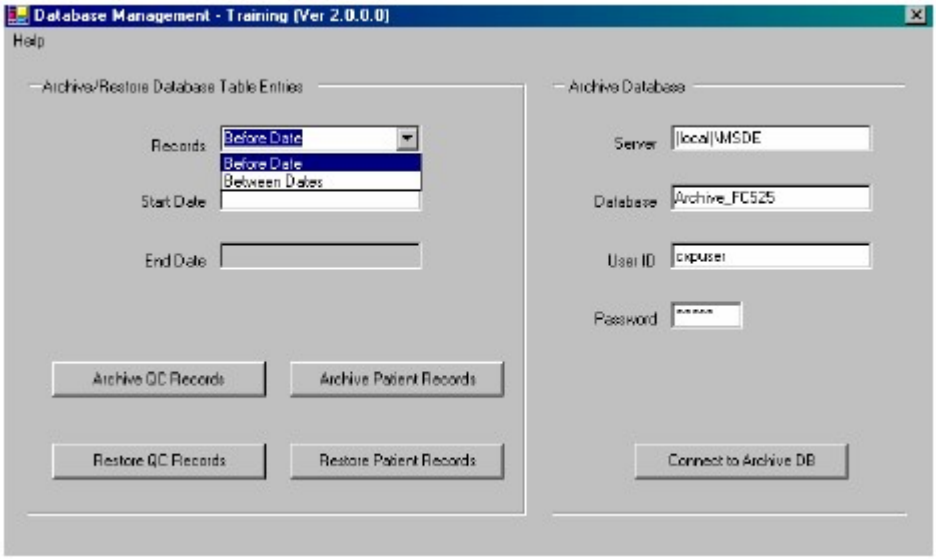


Откроется окно.



Для того чтобы получить доступ к управлению базой нужно ввести пароль «cxppass» в текстовую строку Password. Затем нажмите кнопку Connect to Archive Database (связаться с базой данных). Появится сообщение о том, что соединение произошло.

Теперь Вы можете выбрать записи, которые хотите заархивировать или восстановить. В строке Records выберите критерий: записи созданные до определенной даты (Before Date) или между какими-то датами (Between Dates). После чего нужно указать начальную и конечную даты (Start Date и End Date).



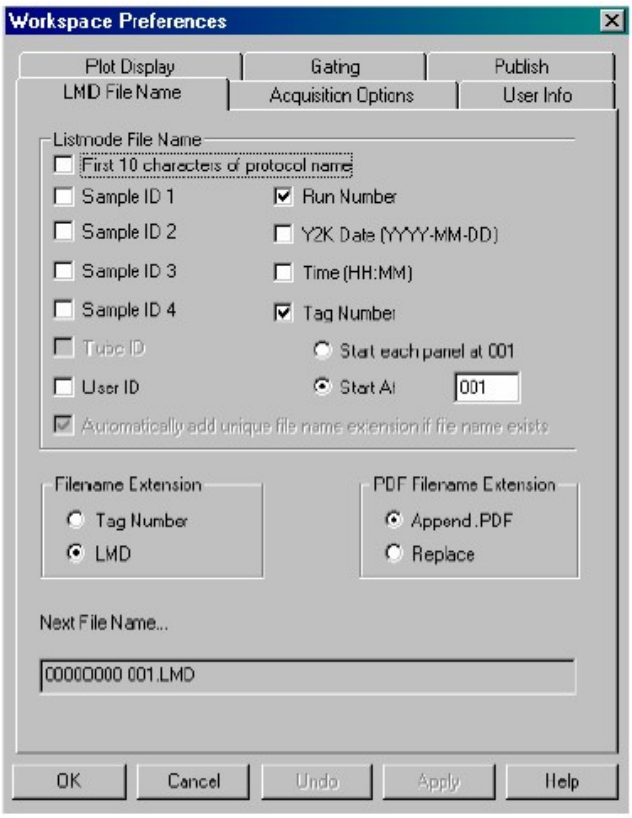
Указав временной интервал, нажмите нужную кнопку:



Раздел 9 – Опция «Workspace Preferences» (установки рабочего пространства)

Опция «Workspace Preferences» позволяет изменять определенные по умолчанию установки рабочего пространства. Это означает, что Вы можете определять, как будут выглядеть все вновь создаваемые графики, формироваться имена файлов данных, как будет осуществляться раскрашивание графиков и т.д. Однако важно помнить, что все изменения, которые Вы сделаете, будут применены ко всем Вашим протоколам, а не только к открытому в данный момент.
В окне «Workspace Preferences» находится 6 вкладок в программе CXP-cytometer и 4 вкладки в программе CXP-analysis, т.к. 2 из них связаны с процессом сбора данных.

Вкладка «LMD filename» (имя файла данных)
В этой опции можно установить формат названия файла.
First 10 Characters of protocol name – выбор этой строки означает, что к названию файла автоматически будет присоединяться имя протокола, в котором он был записан.
Sample ID1, 2, 3, 4 – к названию файла автоматически будет присоединяться отмеченный идентификатор.
User Name – в название файла будет входить имя пользователя.
Automatically add unique filename extension if file already exist – автоматически добавлять уникальное расширение, если файл уже существует – включение этой опции гарантирует, что файл не будет случайно перезаписан, если уже существует одноименный файл в данной папке. Эта опция доступна, если в профиле пользователя нет разрешения на перезаписывание существующих файлов (не отмечено «Overwrite existing data files»). Создание профиля пользователя будет описано далее.



Run Number – система автоматически генерирует номер запуска при каждом запуске анализа образца. Если эта опция отмечена, то номер запуска автоматически будет присоединяться к имени файла, обеспечивая тем самым уникальное имя.

Date – эта опция обеспечивает присоединение даты анализа к имени файла. Формат даты УУУУ-ММ-DD (год-месяц-день).

Time - эта опция обеспечивает присоединение времени анализа к имени файла. Формат времени HH-MM-SS (часы-минуты-секунды).

Tag Number –выбор этой опции означает прибавление к имени файла кодового номера. Если отмечен Tag Number, то активируются следующие пункты:

Start each panel at 001 – при старте каждой новой панели кодовый номер устанавливается на 001.

Start at - при старте каждой новой панели кодовому номеру присваивается значение, устанавливаемое пользователем.

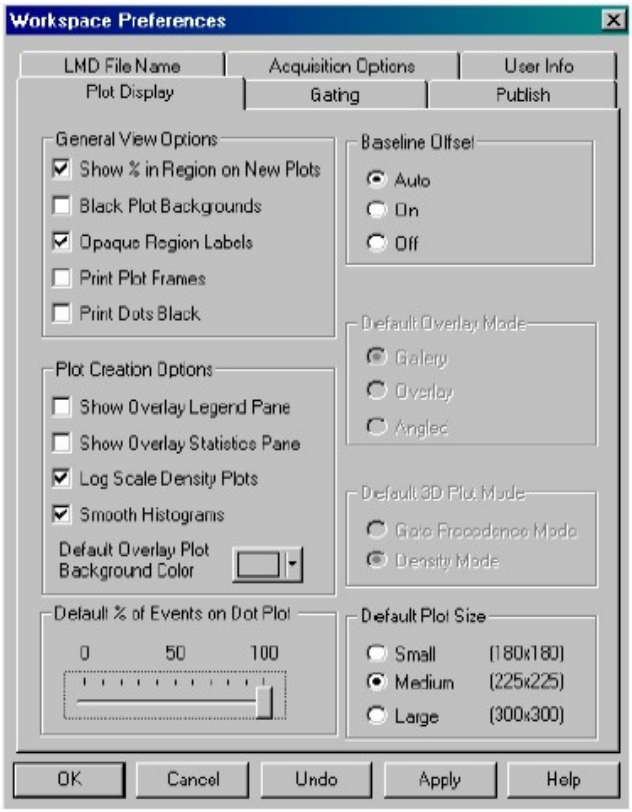
Filename Extension – в этой опции можно установить в качестве расширения файла кодовый номер или LMD.

PDF Filename Extension – позволяет изменить расширение файла .LMD на одно из следующих:

Append .PDF Filename – прибавить PDF к расширению файла данных.

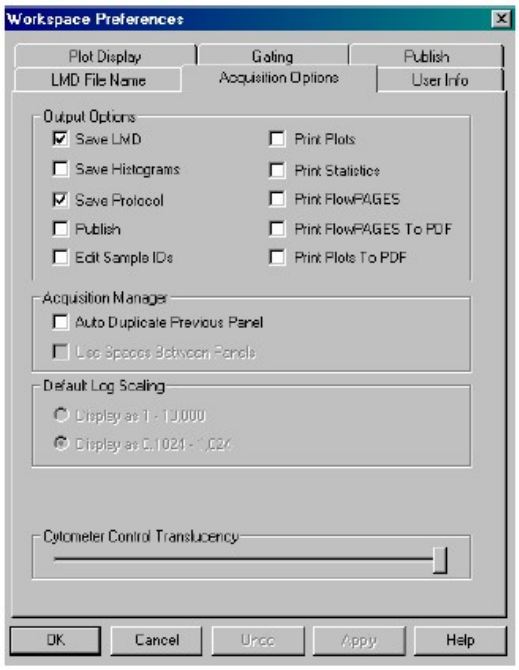
Replace – заменить текущее расширение файла на .PDF. Эту опцию можно использовать только когда используется расширение .LMD.

Вкладка Plot Display (Представление графиков) (опция не доступна в CXP-analysis)



Опции, устанавливаемые в этой вкладке, отражаются на всех графиках. Здесь можно установить общие параметры вида графиков (черный фон, отразить % на регионах) или параметры вывода (печать рамок графиков, печать точек черным). Изменение большинства этих опций отражается только на вновь создаваемых графиках и не влияет на уже существующие. Baseline Offset может применяться и к ранее сохраненным данным. Переключение baseline offset вызывает обновление графиков, представленных на рабочем столе.

Вкладка Acquisition Options (параметры сбора данных)



Print Plots, Print Statistics и т.д. - выбор параметров печати означает, что по окончании анализа образца отмеченные объекты будут автоматически выводиться на печать. Печати происходить не будет, если анализ образца был прерван без сохранения данных (Abort) или при запуске протокола промывки.

Save LMD – эту опцию отключить нельзя. Сохраняются все файлы, за исключением прерванного анализа и при работе протоколов промывки.

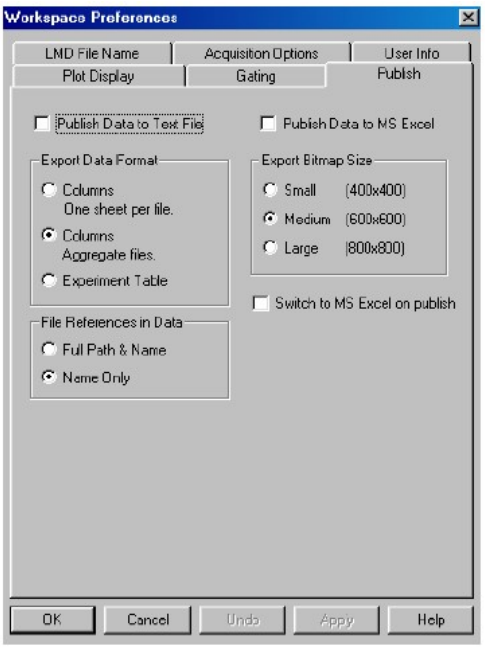
Save Protocol – если эта опция отмечена, то все изменения протокола будут автоматически сохраняться.

Save Histograms – при этой отмеченной опции для графиков, у которых отмечено «Save data in FCS format» в свойствах, будут создаваться файлы гистограмм в FCS-формате с расширением *.HST.

Edit Sample ID – выбор этой опции позволяет редактировать Sample ID после завершения анализа образца. (Эту опцию очень удобно использовать в режиме Single Tube Mode).

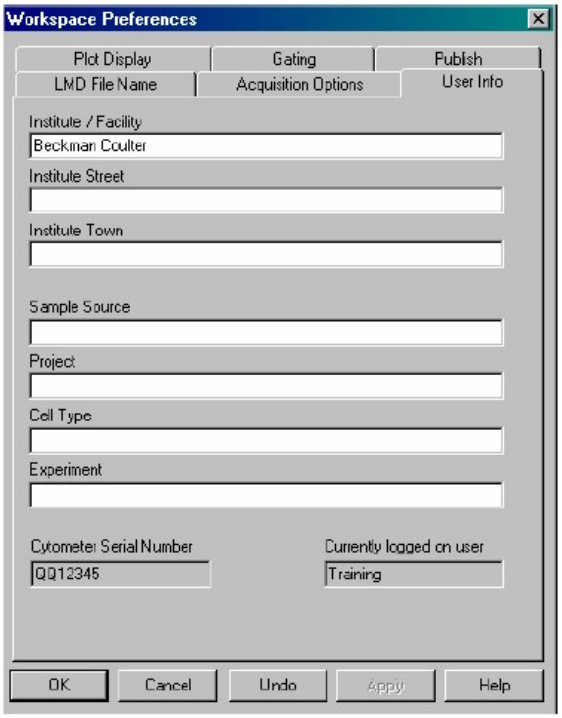
Publish – эта опция осуществляет перенос данных статистики непосредственно в Microsoft Excel или создает текстовый файл (если Microsoft Excel не установлен) по окончании анализа образца. Эта опция работает совместно с Publish Tab.
The Auto Duplicate Previous Panel – автоповтор предыдущей панели. Эта опция работает только в режиме Single Tube Mode.
Cytometer Control Translucency – позволяет сделать окно управления цитометром прозрачным.

Вкладка Publish (публикация данных)



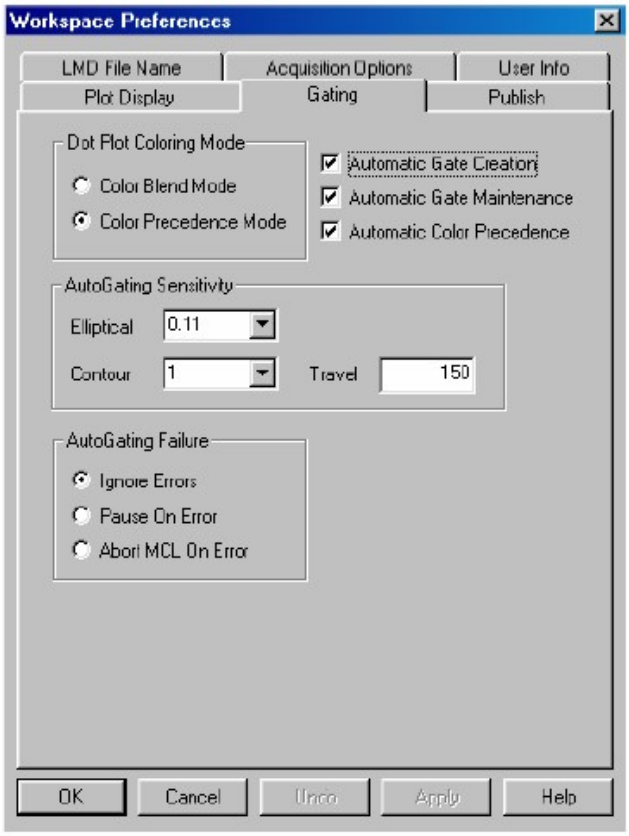
В этой вкладке устанавливают формат статистических данных, переносимых в таблицу. Экспериментальные таблицы объединяются в одну сводную таблицу.
Export Bitmap Size – контролирует размер рисунка при экспорте в другие приложения.

Вкладка User Info



Любая информация, размещенная на этой странице будет сохраняться в файлах данных, ее можно будет поместить на FlowPAGE. Эта вкладка доступна в CXP-analysis, но информация, записанная в этом приложении, не будет сохраняться в файлах LMD.
Замечание: Строка Institute/Facility обязательно должна быть заполнена. Вы не сможете покинуть вкладку до тех пор, пока не заполните это поле.

Вкладка Gating

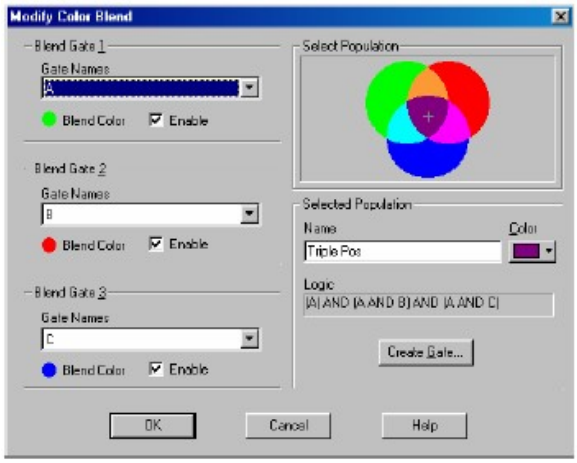


Automatic Gate Creation – автоматическое создание гейта. Отметив эту функцию, при создании региона автоматически будет создаваться гейт, соответствующий этому региону. Если опция не отмечена, то нужно самостоятельно создавать гейты в Analysis -> Create Modify Gates.

Automatic Gate Maintenance – активация этой опции означает, что когда изменяется гейтирование графика, то связанный гейт какого-либо региона этого графика также изменяется, отражая новый статус. Регионы и связанные с ними гейты не могут существовать более чем на одном графике, если эта опция активирована.

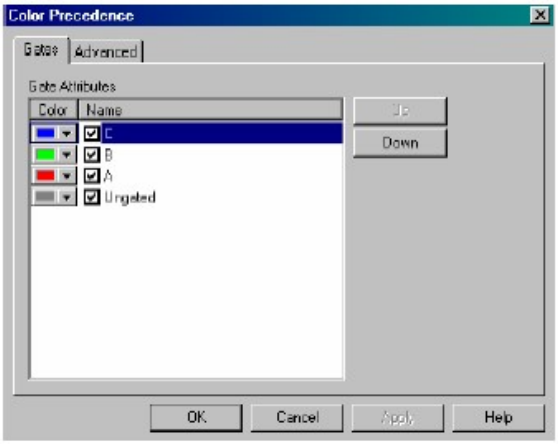
Automatic Color Precedence – при создании нового региона цвет, который присваивается этому гейту, помещается в начало списка. Если опция не отмечена, окрашивания гейта не происходит.

Dot Plot Coloring Mode - переключает режимы Color Blend и Color Precedence.



Color Blend Mode (Analysis -> Modify Color Blend) – опция позволяет смешивать цвета принадлежащие разным регионам. В этом режиме можно использовать максимум 3 региона. Это позволяет по окрашиванию идентифицировать события, которые попадают только в один из этих регионов, в оба или во все.

Color Precedence Mode (Analysis -> Modify Color Precedence) - при создании каждого нового региона ему присваивается цвет и помещается в начало списка. В примере, регион «C» находится в первой строке и является доминирующим регионом. Все события, попадающие внутрь этого региона, будут окрашиваться в синий цвет. Все



события, попадающие в «C» и другие регионы одновременно, также будут окрашены в синий цвет, т.к. «C» - доминирующий регион. Чтобы изменить порядок списка, выделите мышкой нужную строку и переместите ее кнопками «Up» и «Down».

AutoGating Sensitivity - позволяет выбрать чувствительность автогейта.

- **Elliptical Sensitivity** - можно установить 0,11, 0,33 и 1,1 (% высоты обрабатываемого пика). При выборе 0,11 будет создан регион с большим радиусом охвата, 1,1 – создает меньший регион, охватывающий самую плотную область облака клеток.
- **Contour Sensitivity** – установки могут быть 1, 2, 3, 4 и 5. Уровень 1 соответствует 0,11% высоты обрабатываемого пика при разрешении 64X64, уровни 2,3 и 4 соответствуют 0,11, 0,33 и 1,1% при разрешении 128X128. Уровень 5 – 1,1% при разрешении 256X256.
- **Contour Travel** – позволяет установить максимальное отклонение контурного региона автогейта от среднего значения. Минимальный уровень может быть 25, максимальный – 250 каналов. Используйте эту опцию для небольшой настройки автогейта от пробирки к пробирке, если в результате изменений лизиса исследуемая популяция немного смещается. Эта опция не работает для эллипсоидного автогейта.

Autogating Failure - несостоявшийся автогейтинг. Позволяет определить последовательность действий при возникновении ошибки автогейтинга.

- **Pause on Error** – при возникновении ошибки автогейтинга, система останавливает текущий сбор данных и ожидает дальнейшего ввода перед обработкой.
- **Abort on Error** – система автоматически прерывает анализ рабочего списка при возникновении ошибки автогейтинга.
- **Ignore Errors** – система продолжает обработку рабочего списка.

Раздел 10 – Контроль качества, графики Леви-Дженнингса и таблицы данных

Программное обеспечение CXP включает блок управления данными контроля качества, который позволяет вводить название реагента, номер лота, срок годности, дату получения и дату начала использования. Данные контроля качества (QC) экспортируются и представляются в виде графиков Леви-Дженнингса или таблиц данных.

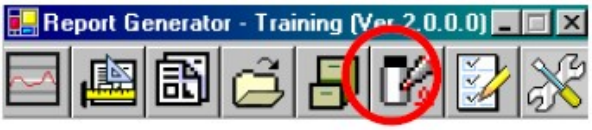
Блок контроля качества будет работать правильно, если:

- Определен продукт контроля качества.
- Основные регионы в QC-протоколе (и данные статистики по ним) обозначены для экспорта и установлен продукт контроля качества.
- Для продукта контроля качества определен шаблон отчета по контролю качества.

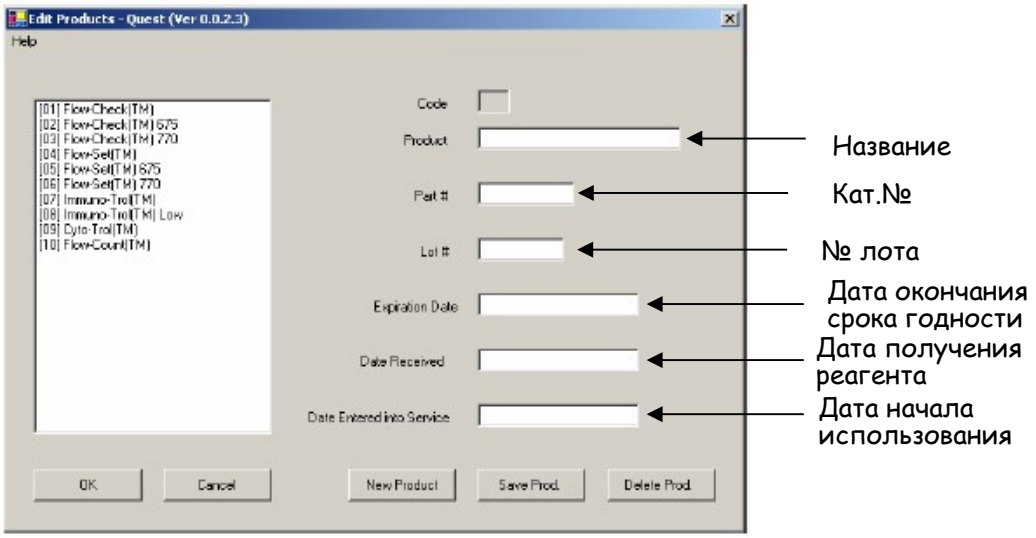
Установки QC

Продукт для контроля качества (продукт QC)

Разверните панель инструментов Report Generator.



Нажмите на иконку Product Editor (редактор продукта). Откроется окно:



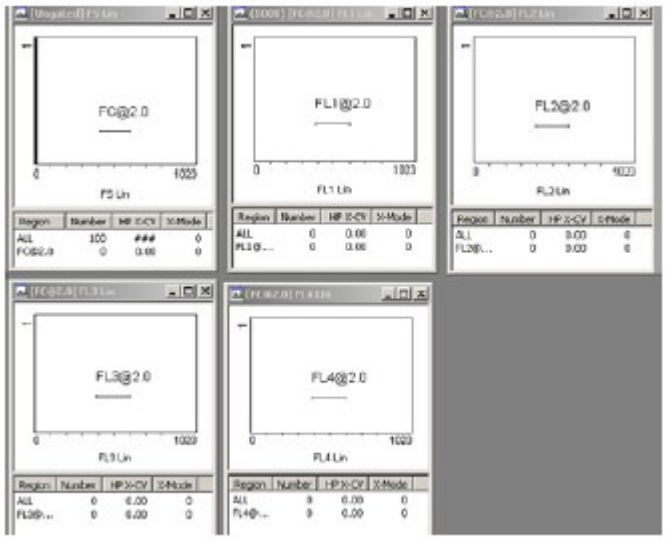
В левой половине находится список реагентов для контроля качества, список можно корректировать (дополнять или удалять позиции).

Выделите строку Flow-Check и заполните поля в правой половине окна. Если информация уже введена, Вы можете корректировать ее (исправлять номер лота, дату и т.д.). После ввода информации нажмите Save Product.

После изменения номера лота Flow-Check график контроля качества продолжается с точки с новым номером продукта. Чтобы посмотреть данные, записанные с предыдущим Flow-Check, нужно открыть шаблон и выбрать номер лота для каждого графика. Каждая точка данных привязана к определенному номеру лота и Вы сможете легко идентифицировать их на графиках.

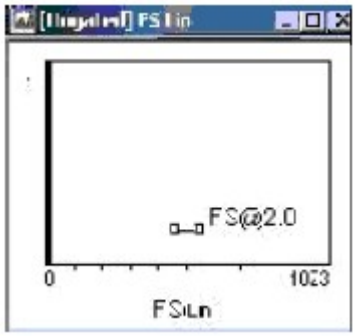
Чтобы закрыть окно Edit Products нажмите OK.

Как выглядит протокол контроля качества (QC-Protocol)?
Откройте протокол QC 4C 1L FITC-PE-ECD-PC5 Flow-Check™_ALIGN, перетащив его из папки Common Acquisition Protocol в Resource Explorer на рабочий стол.



При запуске анализа пробирки с Flow-Check в этом протоколе рассчитываемые HPCV сравниваются со значением, указанным в названии региона. Если HPCV превышает заданную величину, то мастер автонастройки (AutoSetup Wizard) оповестит Вас об этом и предложит перезапустить анализ, прервать его или подкорректировать. Имя региона можно исправить и выставить другие пределы по HPCV, если необходимо.
Замечание: За знаком «@» обязательно должен быть указан предел по HPCV.

Щелкните левой клавишей мыши на регион FC@2.0 на первом графике, чтобы активировать его.



Щелкните правой клавишей мышки и откройте свойства региона. Убедитесь, что отмечено Region statistics exported to Quality Control (экспорт статистик региона в QC) и выбран продукт QC. Нажмите Cancel, когда закончите.
Замечание: В любом протоколе может быть регион, экспортирующий данные статистики в QC.

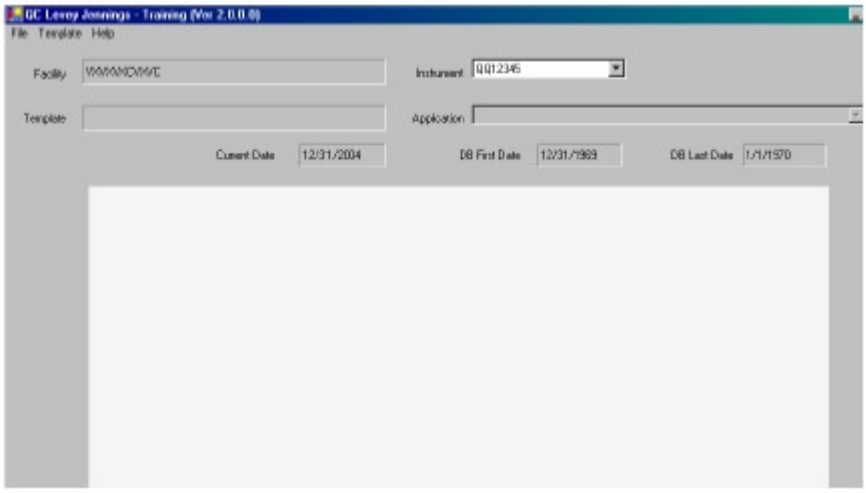
Управление данными контроля качества

Шаблон QC

Разверните панель инструментов Report Generator.

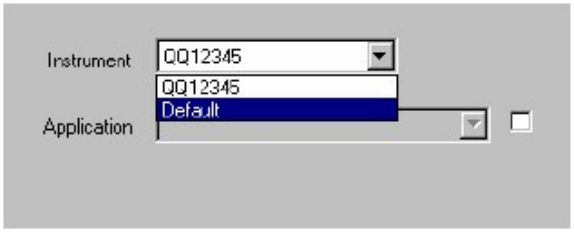


Нажмите на иконку Quality Control Report (отчет контроля качества). Откроется окно QC Levy Jennings:

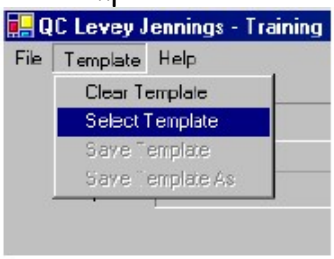


Каждому протоколу Flow-Check, Flow-Set или Verify по умолчанию соответствует свой шаблон QC. Эти шаблоны должны быть ассоциированы с серийным номером прибора. Поэтому после инсталляции CXP нужно связать существующие шаблоны с Вашим прибором. Для этого:

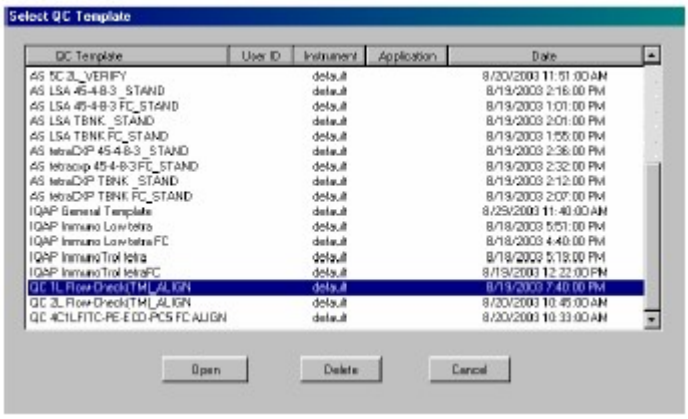
- Установите в строке Instrument надпись Default.



- Выберите Template -> Select Template



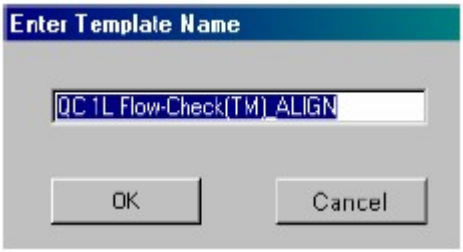
- Найдите нужный протокол (QC 4C 1L Flow-Check™_ALIGN), выделите щелчком мыши и нажмите Open.



- Выберите Template -> Save Template as



- Введите имя шаблона, нажав OK.



Просмотр данных контроля качества – графики Леви-Дженнингса и таблицы данных

- Выберите Template -> Select Template



- Выделите QC 4C 1L Flow-Check™_ALIGN и нажмите Open.

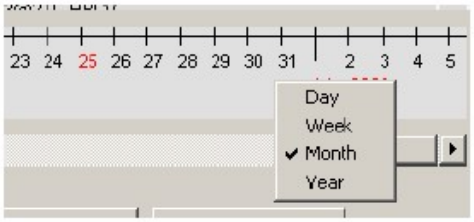
Замечание: Если Вы используете много шаблонов QC, то можно применять фильтр для поиска. Для этого:

В строке Application (приложение) выберите Alignment (список приложений может различаться, в зависимости от того, какие приложения были запущены на Вашем цитометре).

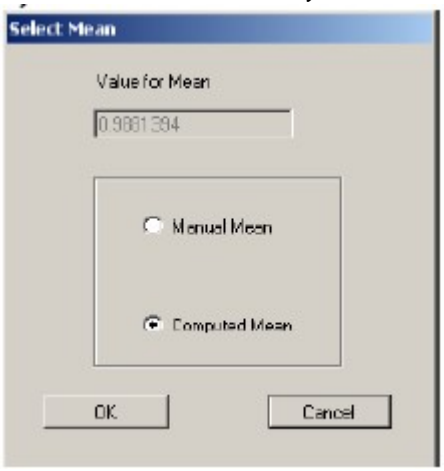


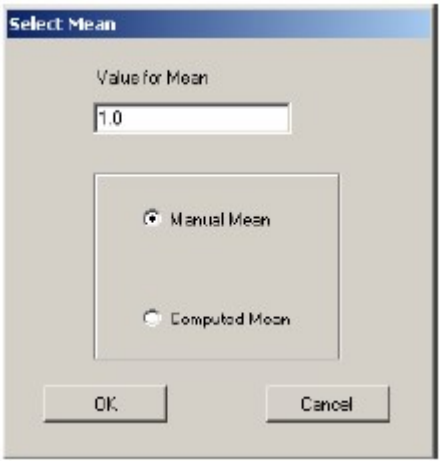
Выбрав Alignment в качестве приложения, Вы увидите в списке только те шаблоны, которые связаны с этим приложением.

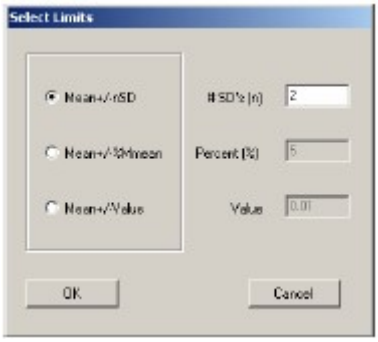
Дату внизу графика можно изменить с месяца (Month) на день (Day), неделю (Week) или год (Year). Для этого щелкните правой клавишей мыши в любое место шкалы.



Среднее значение (Mean) вычисляется автоматически. Если необходимо установить собственный уровень, то щелкните левой клавишей на поле Mean на любом из графиков и введите нужное значение (например, это может быть один из параметров контроля качества Immuno-Troll).



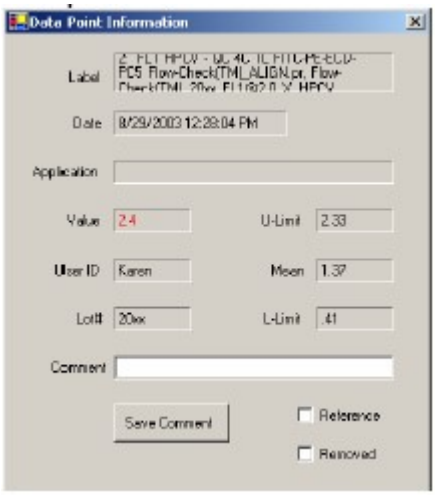




Отклонение по умолчанию выставляется ±2SD (стандартные отклонения). Если нужно их изменить, щелкните левой клавишей мыши на поле нижнего или верхнего предела на любом из графиков и введите нужное значение.

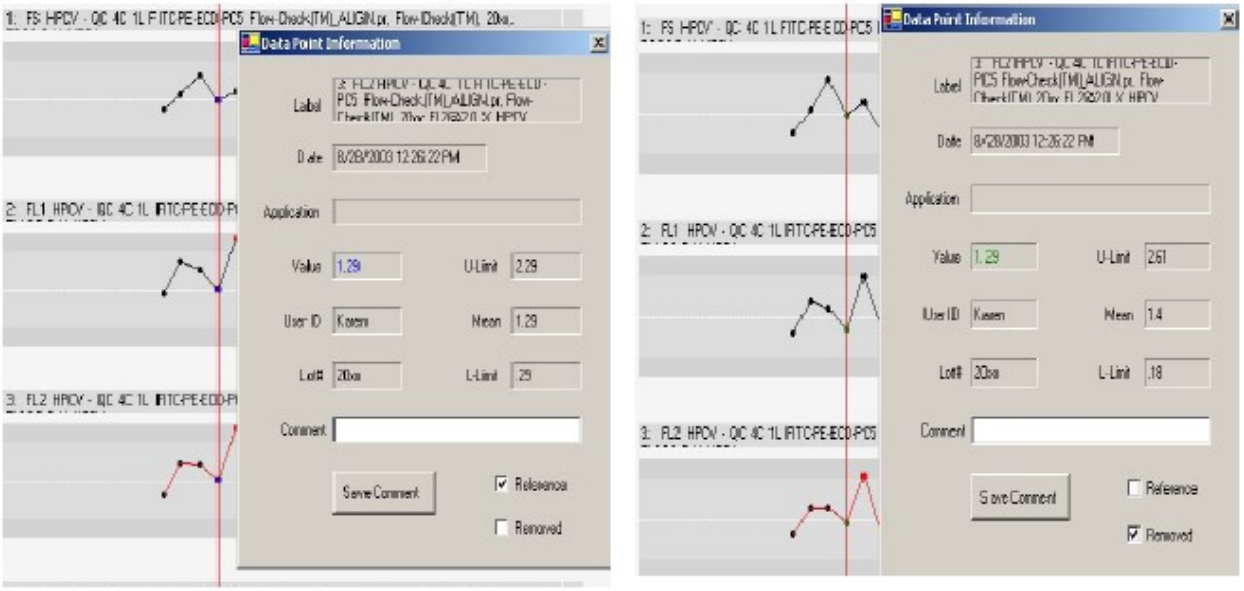
Точки, которые попадают в указанный интервал, окрашены в черный цвет, в противном случае – в красный.

Если щелкнуть левой клавишей мыши на нужную точку, то можно увидеть подробную информацию по каждой точке данных.



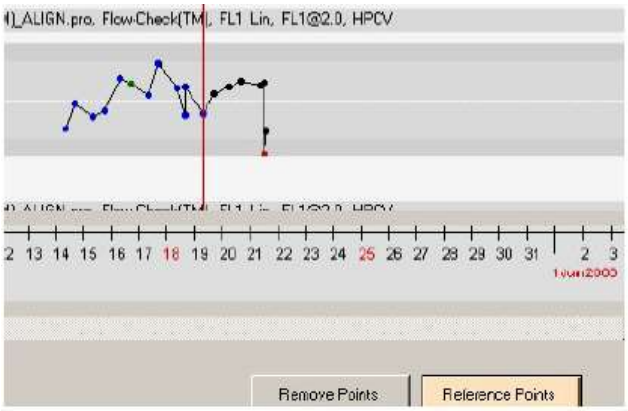
Замечание: Если 2 или более точек были получены в течение небольшого промежутка времени, но на шкале по месяцам они могут накладываться друг на друга. Щелкните правой клавишей мыши на точку и прокрутите колесиком мыши все точки. В открывшемся окне Вы увидите подробную информацию и точное время получения данных.

Точку можно удалить или отметить как референс-точку. Для этого в окне информации о точке отметьте Reference или Removed. В первом случае точка окрасится в синий цвет, во втором – в зеленый.

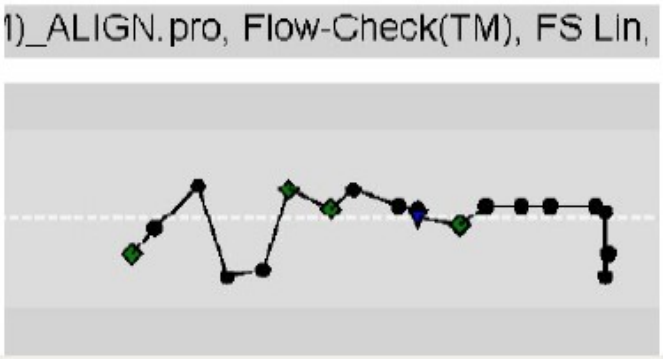


Замечание: Точки, отмеченные на удаление, удаляются только из статистики.
Если нужно отметить на удаление или как референс несколько точек, то нажмите Remove Points или Reference Points внизу графика

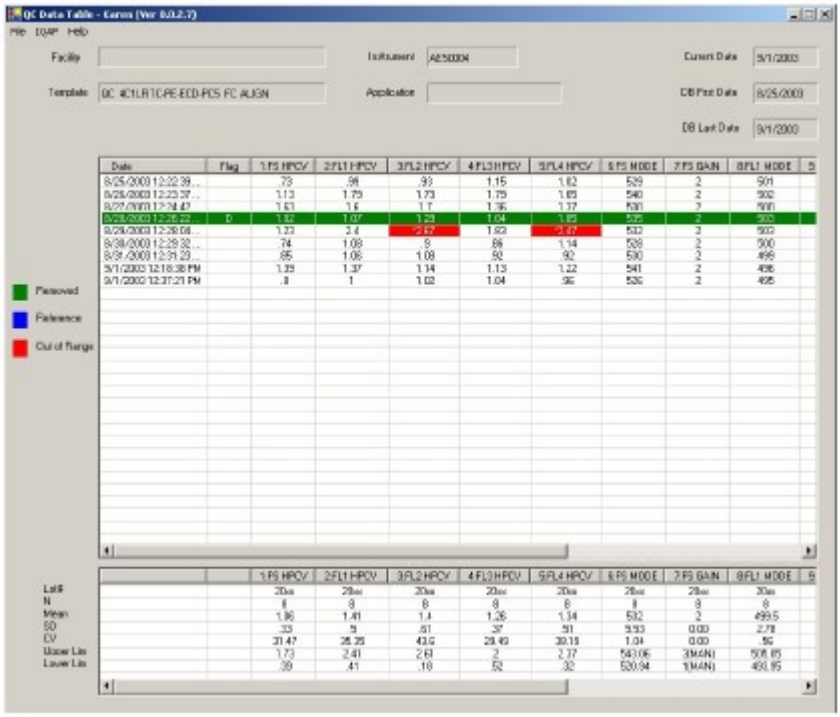
Левой клавишей мыши отметьте первую точку, правой – последнюю. Все точки между ними будут отмечены на удаление или как референс.



При печати на черно-белом принтере синие референсные точки распечатываются в виде треугольников, зеленые – в виде ромбов.



Для каждой точки можно добавить комментарии (в строке Comment).
Нажмите кнопку Data Table в левом нижнем углу окна с графиком Леви-Дженнингса. Откроется таблица данных:



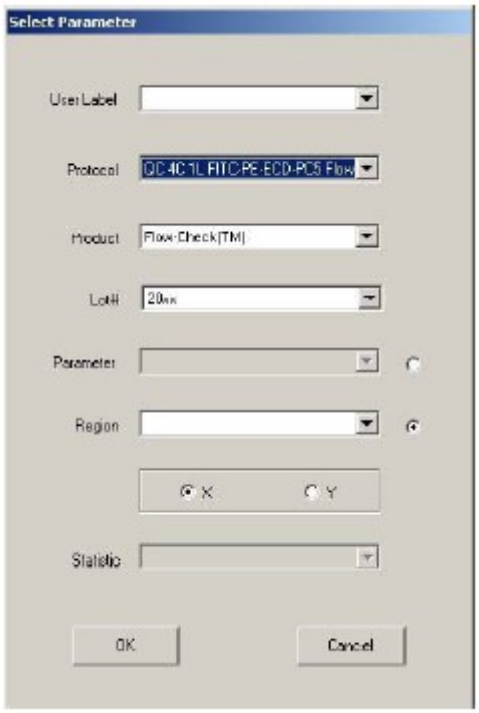
Для печати результатов контроля качества нажмите File -> Print Preview (предварительный просмотр), затем Print.
Если Вы хотите, чтобы данные были представлены в виде текстового файла – выберите File -> Create Spreadsheet File.
Закройте окно таблицы, нажав «X» в правом верхнем углу окна. Вы вернетесь в окно графиков Леви-Дженнингса.

Создание собственного шаблона QC

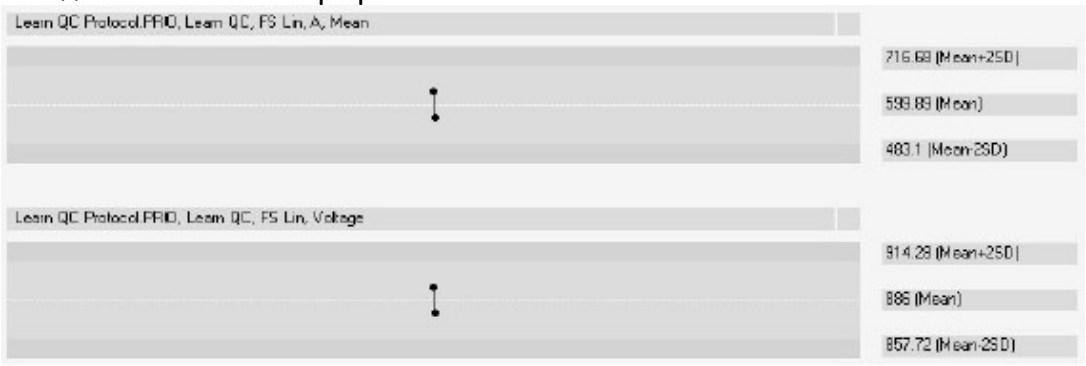
- Введите новый продукт контроля качества (Report Generator -> Product Editor).
- Создайте новый QC-протокол, не забывая обозначить регионы для продукта контроля качества и отметить регион для экспорта в базу QC.
- Один или два раза запустите анализ реагента для контроля качества в этом протоколе.
- Откройте график Леви-Дженнингса (Report Generator ->QC Report).
- Отмените выделение со строки Application (так как Вы не запускали свой новый протокол как часть приложения).
- Если Вы увидели какие-то графики, выберите Template -> Clear Template.
- Нажмите кнопку New Plot справа внизу окна. Откроется график:



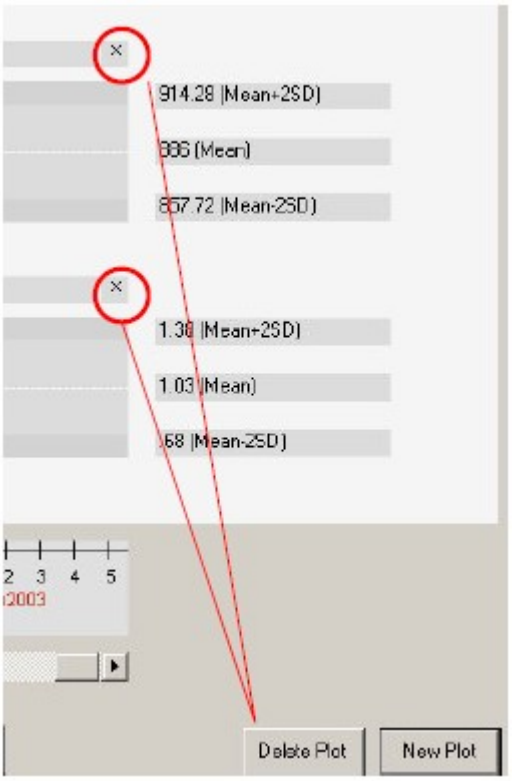
Щелкните мышкой на верхушку графика. Откроется окно, в котором Вы сможете обозначить оси, продукт, номер лота и т.д.



- Создайте несколько графиков:



- Чтобы удалить график нажмите «X» в правом верхнем углу графика.



- Выберите Template -> Save As и введите имя шаблона.

IQAP – аббревиатура для межлабораторной программы контроля качества (Interlaboratory Quality Assurance Program). Эта служба для пользователей Beckman Coulter, использующих Immuno-Trol и CYTO-TROL. Программа позволяет сравнивать Ваши данные с данными других лабораторий.

Раздел 11 – Администраторские функции

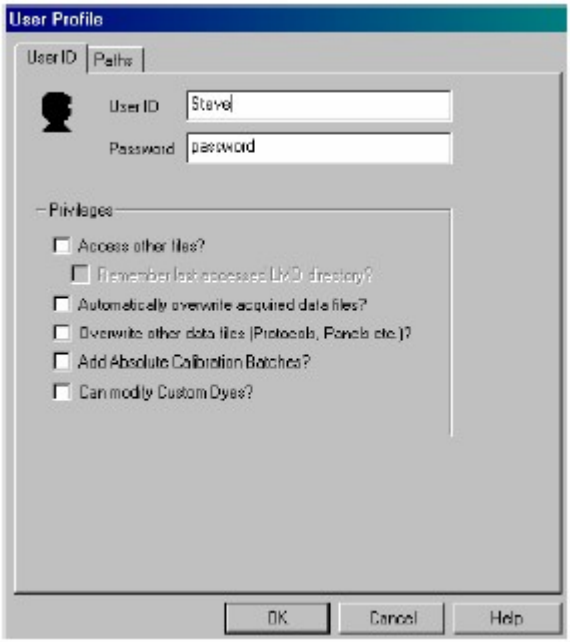
Добавление нового пользователя

При входе в программу CXP выделите имя пользователя Admin, введите пароль (password) и нажмите кнопку Admin.



Нажмите Add User (добавить пользователя) и введите имя нового пользователя.

Замечание: По умолчанию в поле пароль выставляется password. Измените его, если требуется.



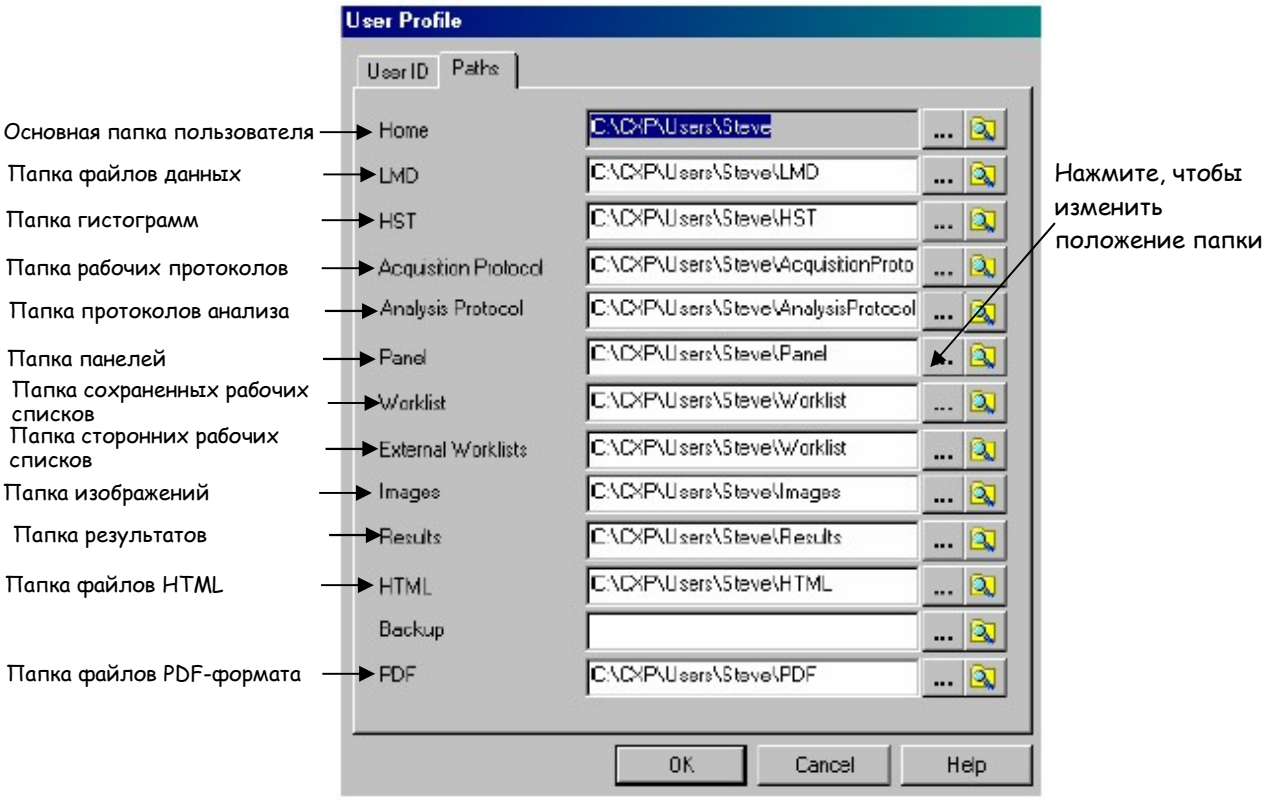
Отметьте возможности, предоставляемые данному пользователю (Privileges).

- **Access Other Files?** – позволяет доступ к файлам, хранящихся в других папках.
- **Automatically Overwrite Acquired Data Files?** – позволяет перезаписывать файлы данных.
- **Overwrite Other Data Files (Protocols, Panels etc)?** – позволяет изменять протоколы и панели. Если не отметить эту опцию, то программа будет каждый раз предлагать сохранять протоколы под новым именем, даже если изменения не были внесены.

- **Add Absolute Calibration Batches?** – позволяет вводить информацию об используемом объеме флуоросфер Flow Count.
- **Can Modify Custom Dye?** – позволяет вводить новые флуоресцентные красители, не включенные в программу CXP по умолчанию.

Нажмите OK. Откроется окно Users Profile (профиль пользователя).

Для пользователя будут созданы несколько папок, в которых предполагается хранить файлы данных, протоколов, панелей и т.д.



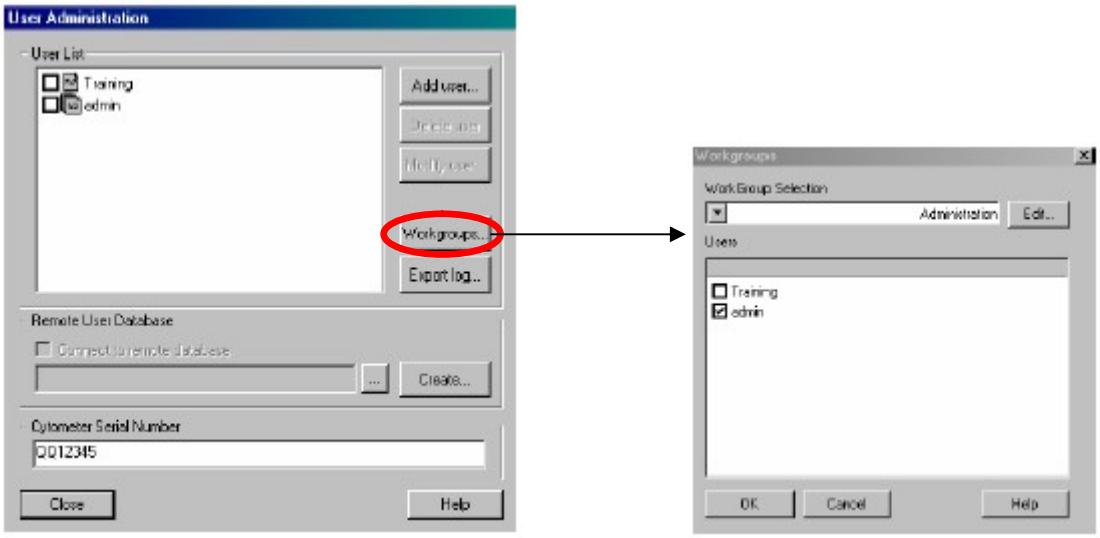
Вы можете изменить местоположение папок, нажав на многоточие в конце строки ... .

Чтобы создать новую папку, нажмите иконку .

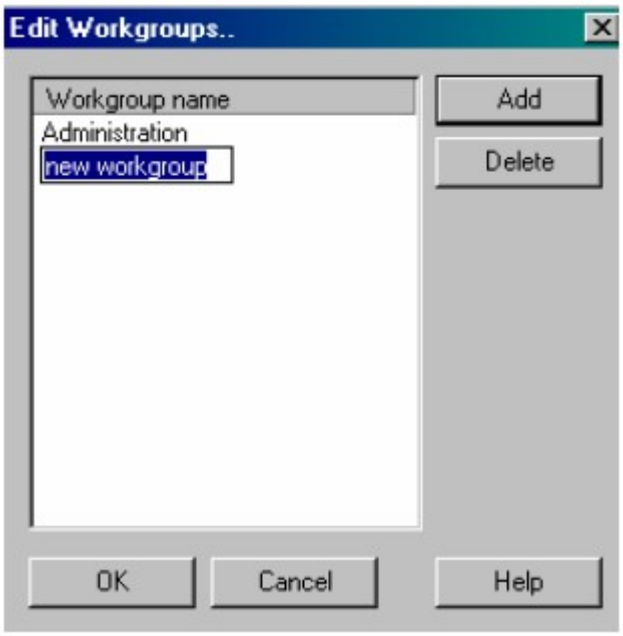
Создание рабочих групп

Рабочую группу можно создать из существующих пользователей. Эта опция обеспечивает пользователю доступ к папкам других пользователей данной группы.

В окне администратора нажмите кнопку Workgroup.



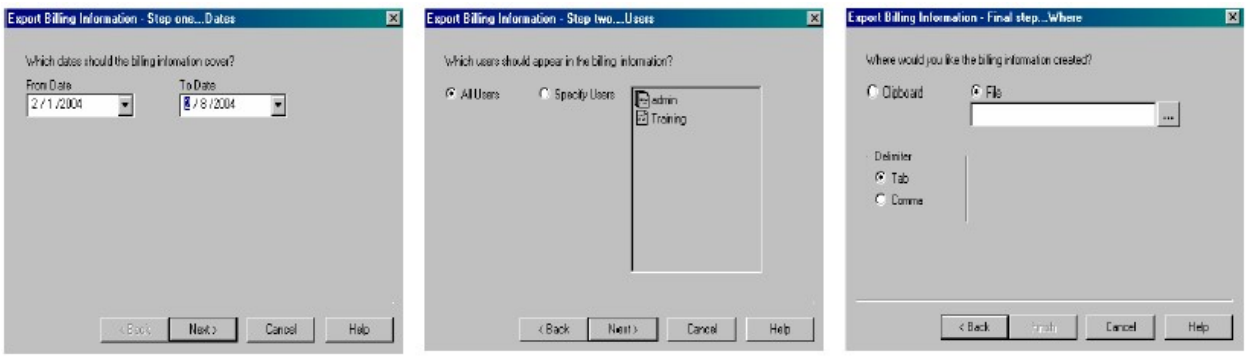
Нажмите кнопу Edit, затем Add.



Введите имя рабочей группы и нажмите OK. Выделите курсором имя новой группы и отметьте пользователей, щелкнув мышкой в квадратах рядом с именем. Нажмите OK.

Создание отчета о работе пользователей

В окне администратора нажмите Export Log. Эта функция позволяет администратору создавать отчет об использовании прибора различными пользователями. Этот отчет можно посмотреть в Notepad или Microsoft Excel.



Раздел 12 – Проблемы и неполадки при работе в программе CXP

Проблемы с полупиковым коэффициентом отклонения (HPCV)
Самая распространенная проблема при работе на проточном цитометре – это выход значения HPCV за установленные пределы. В большинстве случаев это может быть вызвано застреванием пузырьков воздуха или дебриса в проточной ячейке. При возникновении подобной ситуации рекомендуется выполнить ряд действий, которые должны устранить данную проблему.

- Удалите воздушные пузырьки/дебрис из проточной ячейки с помощью режима Prime (нажмите иконку Prime на панели инструментов). Повторите процедуру несколько раз.
- Нажмите иконку Cleanz, чтобы промыть раствором прибор.
- Удостоверьтесь, что резервуары для Isoflow и Cleanz правильно установлены и плотно закрыты.
- Проверьте, нет ли пузырьков воздуха в фильтре для обжимающей жидкости.
- Запустите панель промывки Cleanse Panel, как описано в разделе 1.

Если после этих действий HPCV по-прежнему не укладывается в установленные пределы и это продолжается несколько дней, то, возможно, требуется настройка лазера. В этом случае обратитесь в сервисную службу.

Проблемы с проточной ячейкой
Если на гистограммах отражается очень мало событий или их нет совсем, попробуйте использовать режим Prime. Если после этого проблема не устранилась, возможно, заблокирована линия подачи образца и требуется ее промывка. Обратитесь в сервисную службу.

Ошибка давления в образце (Sample Pressure Error)
Возможными причинами этой ошибки могут быть:

- Пробирка имеет трещины или не плотно прилегает к головке пробозаборника из-за дефекта края пробирки.
- Износ головки пробозаборника, требуется замена. Обратитесь в сервисную службу
- Требуется настройка датчика давления в образце. Обратитесь в сервисную службу.

Проблемы питания и пневматических устройств

- Стрелка манометра на блоке питания выходит за пределы 28-32 PSI. Вы можете корректировать давление с помощью серой ручки под шкалой манометра. Если давление отклоняется от нормы более чем на 5 PSI, обратитесь с сервисную службу.
- Показания вакуумметра выходят за пределы 17 и 30 inches/Hg. Обратитесь в сервисную службу.
- Проверьте на передней панели источника питания – все ли датчики горят зеленым светом. Если нет, переведите выключатель блока в положение «выкл» и снова включите.

Общие сообщения об ошибках

Laser Start Error – Лазер не включился. Это может быть следствием следующих проблем:

- Лазер не исправен.
- Несправна электронная плата лазера.
- Лазер не подключен к электрической сети.

Ошибки карусели (MCL Errors)

MCL Carousel In/Out Error – Карусель не движется при запуске анализа образцов. Это может быть связано с блокадой карусели посторонними предметами или ошибкой давления системы.

MCL Probe Up/Down Error – ошибка подачи пробирки.

MCL Tube Load Error – ошибка загрузки пробирки. Плохой контакт между устройством подачи пробирок и пробиркой. Попробуйте использовать другие пробирки или проверьте головку пробозаборника на износ. Проверьте также наличие штрих-кода на карусели.

MCL Position Error – нет штрих-кода на карусели. Замените карусель.

MCL Tube Up/Down Error – Ошибка подъема/спуска пробирки. Проверьте целостность пробирки. Возможно смещение вортекса относительно карусели (в этом случае обратитесь в сервисную службу).

System Vacuum Error – ошибка вакуумной системы. Жидкость в вакуумной ловушке. Очистите ловушку. Если ситуация не изменилась, обратитесь в сервисную службу.

Раздел 13 – Реагенты контроля качества

Флуоросферы Flow Check

Флуоросферы Flow Check – это латексные флуоресцирующие частицы, диаметром 10 мкм. Этот реагент используют для ежедневной проверки настройки аргонового (488 нм) и/или гелий-неонового (633 нм) лазера. Существует 3 вида частиц Flow Check:

- **Стандартные Flow Check** – детектируются на каналах FS, SS, FL1, FL2, FL3 и FL4 аргонового лазера (488 нм).
- **Flow Check 770** – используется для проверки канала FL5 аргонового лазера (488 нм).
- **Flow Check 675** – используется для проверки канала FL4 гелий-неонового лазера (633нм).

Основной статистический показатель, используемый для проверки оптической системы – полупиковый коэффициент отклонения (HPCV) должен находиться в следующих диапазонах:

- Менее 2% на каналах FS, FL1, FL2, FL3 и FL4 при использовании стандартных Flow Check.
- Менее 4% на канале FL5 при использовании Flow Check 770.
- Менее 2,5% на каналах FS и FL4 при использовании Flow Check 675.

Кроме того, можно контролировать стабильность потока на графике FL1-Time.

Флуоросферы Flow-Set

Флуоросферы Flow-Set – латексные частицы размером 3,6 мкм с интенсивностью флуоресценции сходной с флуоресценцией антител к поверхностным маркерам, меченных флуорохромами. Этот реагент используют для стандартизации фотоумножителей. При ежедневном запуске Flow-Set контролируют среднюю интенсивность флуоресценции на каналах. Если значения отклоняются от среднего, необходимо настроить напряжение на канале. Эти изменения затем применяются ко всем протоколам. Такая настройка особенно важна при длительных исследованиях одного и того же параметра или когда необходимо оценивать интенсивность флуоресценции (например, при типировании HLA B27). В некоторых исследованиях можно добавлять частицы непосредственно в исследуемый образец и использовать как внутренний контроль. Также этот реагент используется для работы в панели автонастройки.

Существует 3 вида частиц Flow-Set:

- **Стандартные Flow-Set** – используется для настройки каналов FS, SS, FL1, FL2, FL3 и FL4 аргонового лазера (488 нм).
- **Flow-Set 770** – используется для настройки канала FL5 аргонового лазера (488 нм).
- **Flow-Set 675** – используется для настройки канала FL4 гелий-неонового лазера (633нм).

Флуоросферы Immuno-Bright

Флуоросферы Immuno-Bright используют для проверки линейности фотоумножителей один раз в месяц. В набор входит 5 видов частиц с нарастающей интенсивностью флуоресценции. Их помещают в одну пробирку и затем анализируют на каналах

флуоресценции (FL1, FL2, FL3 и FL4). Затем информацию по средним значениям флуоресценции переносят на заготовку для графика, прилагаемую к набору и проверяют линейность графика.
Флуоросферы Immuno-Bright позволяют проверить линейность только первых четырех каналов аргонового лазера.

Контрольные клетки Cyto-Trol
Контрольные клетки Cyto-Trol – лиофильно высушенные лимфоциты с известной экспрессией основных лимфоцитарных маркеров (CD3, CD4, CD8 и т.д.). Этот реагент используется для контроля гейтирования, подсчета абсолютного количества субпопуляций по двухплатформенной технологии, для сравнения результатов полученных по одно- и двухплатформенной технологии. Желательно анализировать Cyto-Trol один раз в день наряду с образцами пациентов.

Контрольные клетки Immuno-Trol
Контрольные клетки Immuno-Trol – стабилизированная цельная кровь с известным количеством лимфоцитарных, моноцитарных и гранулоцитарных маркеров, включая каппа, лямбда и некоторые лейкозные молекулы. Так как Immuno-Trol препарат цельной крови, то можно использовать его для проверки пробоподготовки (качество лизиса) и гейтинга. Желательно анализировать Immuno-Trol один раз в день наряду с образцами пациентов.

Контрольные клетки Immuno-Trol Low
Этот реагент полностью сходен с предыдущим, за исключением уровня CD4+ лимфоцитов. Этот показатель снижен, как наблюдается у пациентов со СПИД.

Stem-Trol Control Cells
Stem-Trol Control Cells – суспензия клеток с известным количеством CD34-позитивных клеток. Позволяет контролировать качество анализа абсолютного и относительного количества стволовых клеток. Рекомендуется запускать анализ Stem-Trol один раз в день наряду с образцами пациентов.

Раздел 14 – Моноклональные антитела, реагенты и устройства для пробоподготовки

Компания Beckman Coulter представляет несколько линий моноклональных антител: CytoStat, OptiClone, Coulter Clone, IOTest и IOTest3.

CytoStat – эти антитела используются в количестве 10 мкл на 100 мкл клеточной суспензии или цельной крови. После 10-15 минутной инкубации при комнатной температуре клетки разводят 1 мл фосфатно-солевого буфера в случае клеточной суспензии или проводят лизис эритроцитов, после этого проба готова для анализа. Для этих антител рекомендована безотмывочная технология.

OptiClone – рекомендации по использованию антител этой линии сходны с CytoStat, однако их используют в количестве 20 мкл на 100 мкл образца.

Coulter Clone, IOTest и IOTest3 – антитела этой линии ***можно использовать в безотмывочной технологии***, но для получения оптимальных результатов рекомендуется проводить отмывку от несвязавшихся антител. 20 мкл антител смешивают с 100 мкл клеток или крови и после 20 минут инкубации добавляют 1 мл фосфатно-солевого буфера в случае клеточной суспензии или проводят лизис эритроцитов, после этого проба готова для анализа. Либо проведите отмывку от несвязавшихся антител.

Лизирующие реагенты

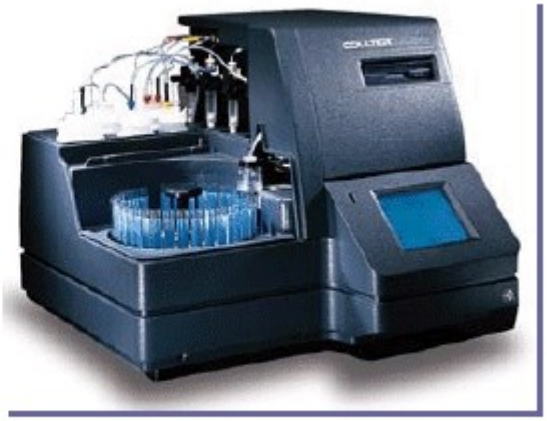
Система ImmunoPrep

ImmunoPrep состоит из 3-х компонентов:
Реагент А – лизирующий раствор.
Реагент В – стабилизирующий агент, который прекращает действие реагента А.
Реагент С – фиксирующий раствор (0,5% параформальдегид).

Эта система обычно используется в устройствах для пробоподготовки Q-Prep, TQ-Prep или MultiQ-Prep. Эти инструменты проводят автоматическое дозирование реагентов и лизис эритроцитов. Реагенты можно дозировать и вручную, однако важно точно соблюдать объем и время дозирования.



Q-Prep



T-Q-Prep

Лизирующий агент OptiLyse C

Этот раствор позволяет проводить лизис эритроцитов и фиксацию клеток одновременно. Optilyse C используют в безотмывочной пробоподготовке. 0,5 мл этого раствора добавляют к образцу после инкубации с антителами, перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляют 0,5 мл фосфатно-солевого буфера или ISOTON II, перемешивают и выдерживают еще 5 мин. После этого проба готова к анализу.

Лизирующий агент OptiLyse B

Этот реагент разработан специально для использования на проточных цитометрах Becton Dickinson и не предназначен для приборов Beckman Coulter.

IOTest3 Lysing Solution – лизирующий раствор на основе хлорида аммония

Реагент представляет собой 10-кратный раствор хлорида аммония, который разводят дистиллированной водой непосредственно перед использованием. К образцу крови с антителами добавляют 2 мл разведенного лизирующего раствора, перемешивают и оставляют на 10 мин. После этого можно провести отмывку от лизирующего раствора путем центрифугирования при 400g 5 мин и ресуспендировать в 0,5 – 1 мл фосфатно-солевого буфера. Если пробы предполагается хранить более 1ч, то можно их зафиксировать добавлением **IOTest3 Fixative Solution**. IOTest3 Lysing Solution и IOTest3 Fixative Solution предназначены для использования с любыми линиями антител.

IntraPrep – набор реагентов для пермеабилизации клеток

IntraPrep используется для внутриклеточного окрашивания. Состоит из 2-х реагентов – фиксирующего и пермеабилизующего. Подходит для пермеабилизации клеток цельной крови.

VersaLyse

Versalyse является более мягким лизирующим раствором, по сравнению с IOTest3 Lysing Solution. VersaLyse не содержит фиксирующих компонентов и практически не

влияет на жизнеспособность клеток, хотя образцы стабильны в течение 6 ч после лизиса. Этот реагент подходит для функциональных исследований.



Устройство для отмывки клеток – Cell Washer

Cell Washer – устройство для автоматической отмывки клеток при работе с антителами по отмывочной технологии. Фильтры, которые используются в устройстве, позволяют проводить отмывку как до, так и после лизиса.



Пробоподготовщик PrepPlusII

Эта система автоматически дозирует антитела и кровь (или другие образцы) в пробирки для анализа. Затем карусель с пробирками переносят с устройство TQ-Prep, где проходят дальнейшие этапы пробоподготовки.



Раздел 15 – Подсчет абсолютного количества клеток

При анализе образца на проточном цитометре мы получаем процент клеток экспрессирующих или не экспрессирующих данный маркер. Однако объем проанализированного образца не известен и поэтому подсчитать абсолютную концентрацию клеток не представляется возможным. Традиционный способ получения абсолютных значений – это вычисление параметра с учетом данных общего анализа крови по формуле:

Абсолют. кол-во CD3-позитивных клеток = *Концентрация лимфоцитов с гематологического анализатора* X *%CD3-позитивных лимфоцитов с проточного цитометра*

Этот метод называется двухплатформенной техникой.

Точность метода зависит от двух приборов, и, следовательно, вероятность ошибки удваивается.

Возможность получать абсолютное количество клеток непосредственно с проточного цитометра обеспечивает большую точность результата. Этот метод называется одноплатформенной техникой и включает в себя использование флуоросфер Flow-Count. Флуоросферы добавляют непосредственно в пробу в отношении проба:частицы = 1:1 по объему, и расчет производится по формуле:

$$\text{Абсолют. кол-во CD3-позитивных клеток} = \frac{\text{Кол-во событий в регионе}}{\text{Кол-во событий в регионе CAL}} \times \text{Проанализированный объем Flow-Count}$$

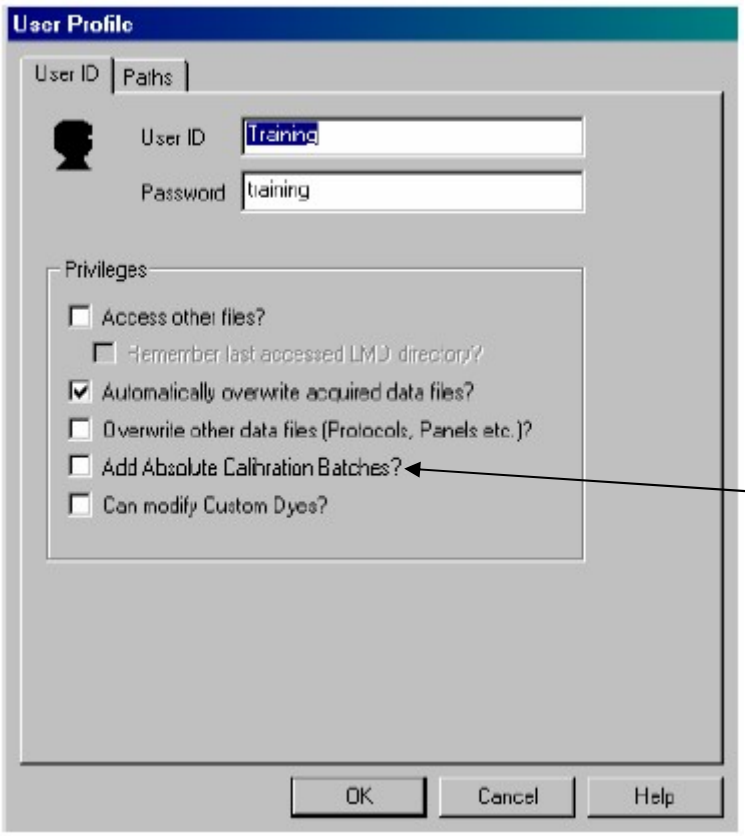
Пробоподготовка

- Добавьте в пробирку моноклональные антитела и образец крови (или выделенные клетки) в соотношении, рекомендованном в инструкции к антителам (например, 20 мкл антител и 100 мкл цельной крови).
- Инкубируйте в течение рекомендованного в инструкции времени.
- Выполните лизис пробы в случае цельной крови или добавьте 1 мл фосфатно-солевого буфера при окрашивании выделенных клеток.
- Добавьте 100 мкл Flow-Count.
- Проанализируйте пробу на проточном цитометре в течение 1 ч.

Анализ на проточном цитометре

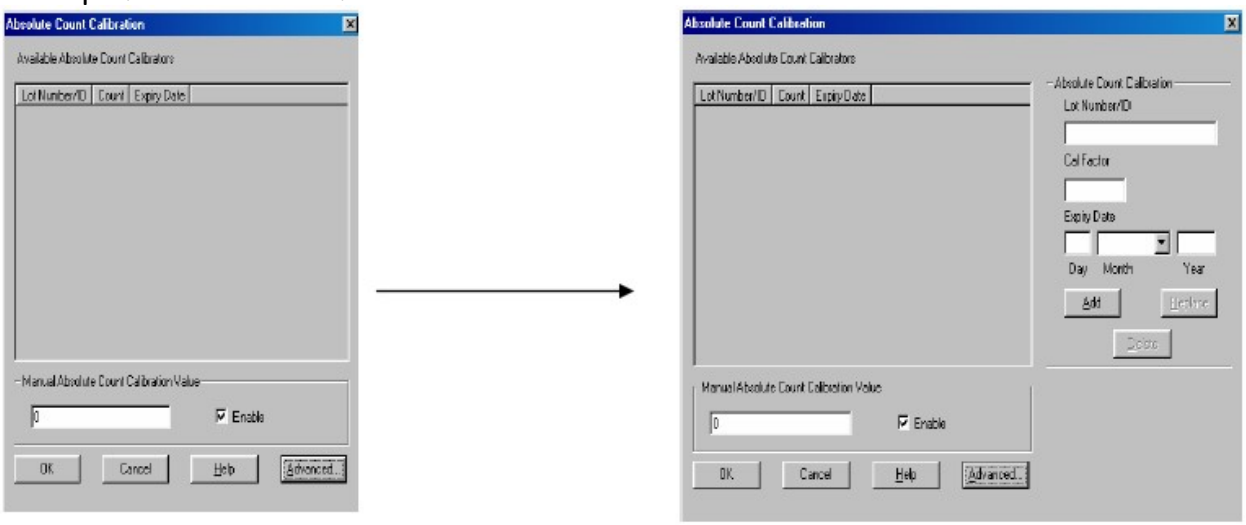
Начальные установки

Перед тем как приступить к анализу абсолютного количества клеток, нужно ввести объем Flow-Count, который Вы будете использовать. Это можно сделать, если в профиле пользователя была отмечена такая возможность (см. Администраторские функции).



Отметьте эту строку, чтобы получить возможность использовать Flow-Count

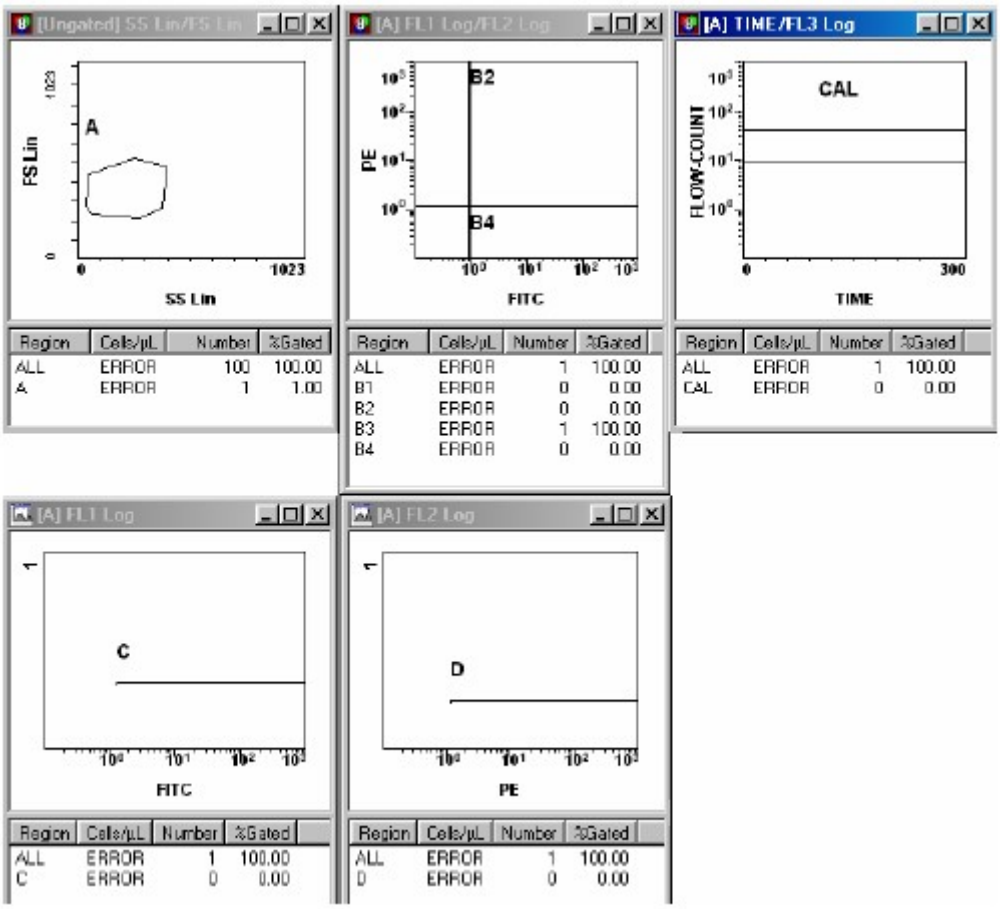
Чтобы ввести информацию об используемом Flow-Count, выберите Analysis -> Absolute Count Calibration. Нажмите кнопку Advanced, откроется окно информации о калибрационных частицах.



Заполните информационные поля. Чтобы ввести объем, нажмите Add и введите нужное число в левую часть окна.

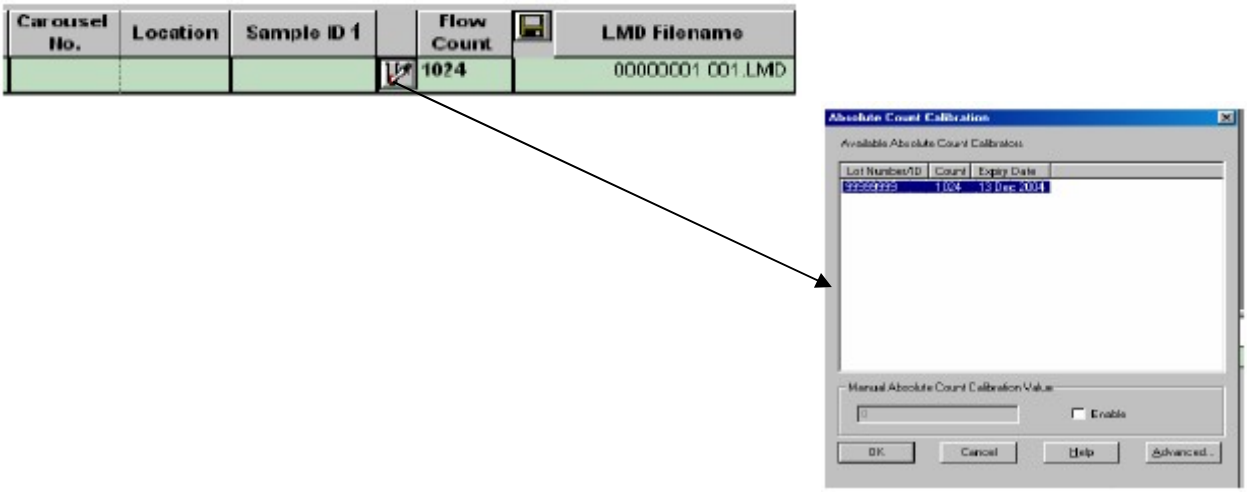
Создание протокола для абсолютного подсчета клеток

Для создания такого протокола нужно выполнить стандартную последовательность действий (см. раздел «Создание протокола») с тем дополнением, что регион, включающий флуоросферы должен называться CAL. Лучше вынести Flow-Check на отдельный график и убедиться, что в регион не попадают дуплеты. Типичный протокол для подсчета абсолютного количества клеток выглядит следующим образом:



Анализ образца с Flow-Count

Откройте протокол, в котором Вы собираетесь проводить анализ. Для того чтобы подсчитать абсолютное количество клеток, нужно ввести текущий объем Flow-Count в Acquisition Manager. Для этого нажмите на иконку  в колонке Flow-Count. Откроется окно Absolute Calibration Count.



Выделите используемую партию Flow-Count и нажмите OK.

Особенности пробоподготовки при использовании Flow-Count

- Flow-Count можно использовать при безотмывочной технологии пробоподготовки, т.к. при отмывке теряется неизвестное количество клеток.
- Процедура требует точного пипетирования, объем образца должен быть точно равен объему Flow-Count. Рекомендуется использовать пипетки с фиксированным объемом или метод обратного пипетирования.
- Очень важно тщательно перемешивать Flow-Count. При первом использовании реагент следует перемешать на вортексе в течение 5 секунд. В дальнейшем достаточно несколько раз перевернуть и покачать флакон рукой.
- При вскрытии флакона нужно полностью удалить фольгу. В противном случае, возможна утечка реагента, если флакон будет храниться не вертикально.

Раздел 16 - Мастер автонастройки Autosetup II Wizard

Мастер автонастройки позволяет автоматически определять правильное значение напряжения, усиления и цветовой компенсации для специальных задач, создавая файл настройки «Settings file», который можно импортировать в другие протоколы и панели.

Необходимые материалы:

- Частицы Flow-Set
- Наборы для компенсации QuickComp 4 Kit и PC7 Set-up Kit
- Клетки Cyto-Comp
- Контрольные клетки Immuno-Trol, окрашенные антителами CD45/CD8/CD4/CD3 и CD45/CD56/CD19/CD3.

Как работает мастер автонастройки?

Программное обеспечение CXP Cytometer содержит ряд панелей, которые помогают настроить FC500, но не видны в Resource Explorer. Большинство таких панелей запускают вместе с протоколом для Flow-Set. При запуске анализа проб, окрашенных одноцветными антителами, в этих протоколах вычисляется спектральное перекрытие между детекторами флуоресценции и определяются оптимальные значения цветовой компенсации. Полученные настройки переносятся в специальный файл настройки «Settings file», затем эти параметры проверяются на пробном образце, например Immuno-Trol, который запускают в конце панели. Ниже представлена типичная панель автонастройки для однолазерного FC500:

Protocol	Region Source	Cytosettings	P1
AS 5C 1L_STAND.pro		AS 5C 1L Settings.pro	FS Lin
AS 5C 1L_FL1.pro		VERIFYING_AS 5C 1L Settings.pro	FS Lin
AS 5C 1L_FL2.pro		VERIFYING_AS 5C 1L Settings.pro	FS Lin
AS 5C 1L_FL3.pro		VERIFYING_AS 5C 1L Settings.pro	FS Lin
AS 5C 1L_FL4.pro		VERIFYING_AS 5C 1L Settings.pro	FS Lin
AS 5C 1L_FL5.pro		VERIFYING_AS 5C 1L Settings.pro	FS Lin
AS 5C 1L_VERIFY.pro		VERIFYING_AS 5C 1L Settings.pro	FS Lin

Какие образцы требуются для автонастройки?

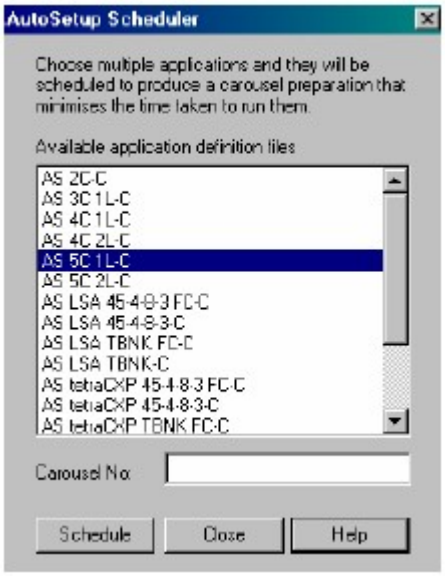
Первый образец панели автонастройки - частицы Flow-Set. Используемая комбинация частиц Flow-Set зависит от количества используемых каналов флуоресценции. Образцы, которые используются для вычисления цветовой компенсации – клетки Cyto-Comp, окрашенные антителами к CD45 с различными флуоресцентными метками (из наборов QuickComp 4 Kit и PC7 Set-up Kit). Окраска CD45 используется потому, что этот реагент дает четкий интенсивный сигнал, позволяющий правильно вычислить настройки. И, наконец, последним идет образец Immuno-Trol, окрашенный антителами CD45/CD8/CD4/CD3, для проверки и коррекции настроек. Для типичной панели автонастройки по 5 каналам флуоресценции требуются следующие образцы:

- Стандартные частицы Flow-Set + Flow-Set 770
- Лимфоциты, окрашенные CD45-FITC
- Лимфоциты, окрашенные CD45-PE

- Лимфоциты, окрашенные CD45-ECD
- Лимфоциты, окрашенные CD45-PC5
- Лимфоциты, окрашенные CD45-PC7
- Immuno-Trol, окрашенный CD45/CD8/CD4/CD3.

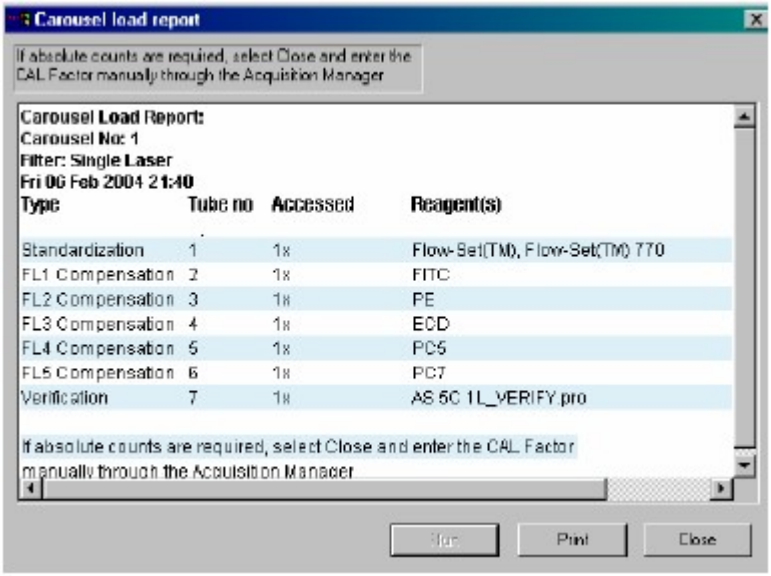
Запуск панели автонастройки

Панель автонастройки запускают из планировщика автонастройки (**AutoSetup Scheduler**). Выберите в меню Tools -> AutoSetup Scheduler. Появится список панелей автонастройки. Выберите панель AS 5C 1L-C и введите номер карусели.



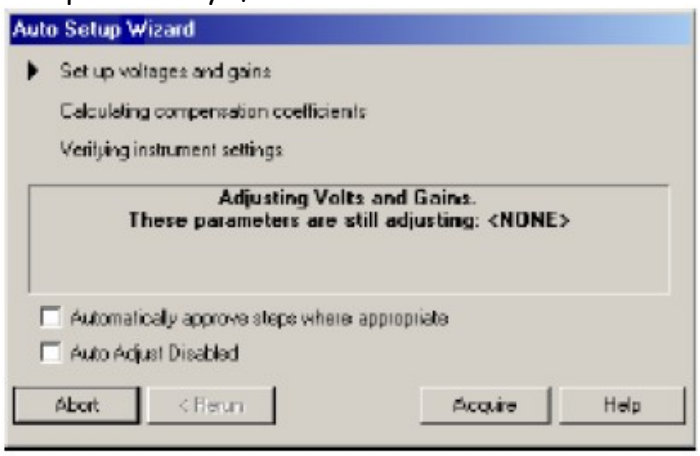
Щелкните мышкой на кнопку «Scheduler» и приложение создаст отчет загрузки карусели и автоматически заполнит Acquisition Manager соответствующими протоколами.

Замечание. Важной особенностью AutoSetup Scheduler является то, что Вы можете составить список из нескольких панелей в одно время. Это означает, что, например, одновременно Вы можете запустить для автонастройки 5-цветную панель, 2-цветную «отмывочную» панель и 3-хцветную «безотмывочную» панель. Отчет загрузки карусели создаст список необходимых образцов для автонастройки и укажет, что некоторые образцы могут использоваться несколько раз.

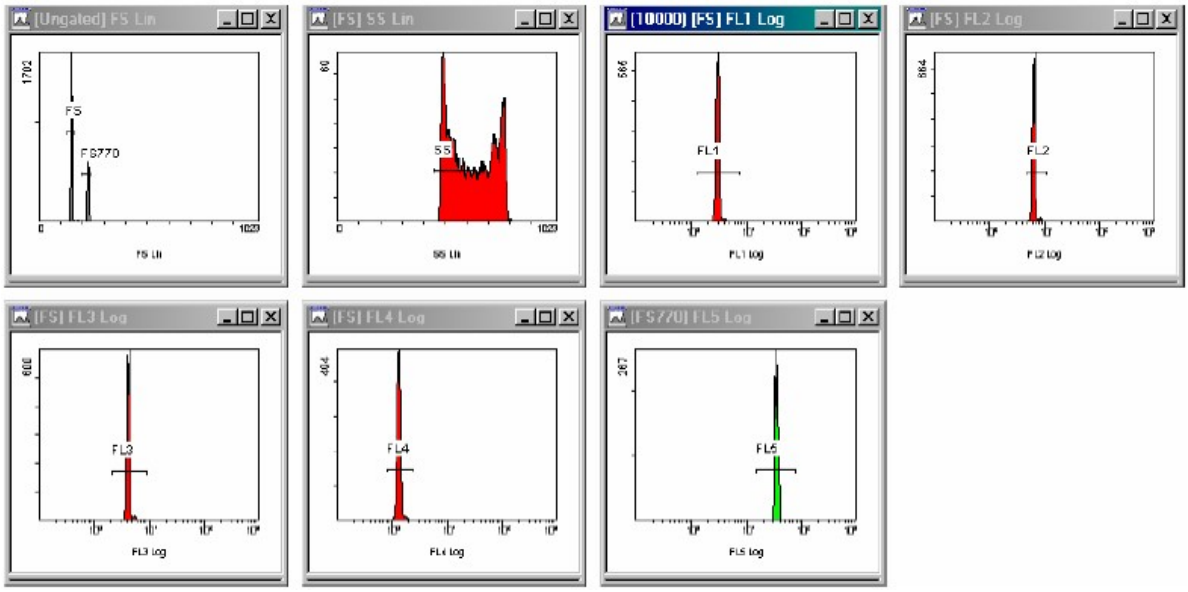


Если Вы хотите распечатать отчет, нажмите Print. Если не требуется вычислять концентрацию клеток (Кл/мкл) нажмите Run для запуска панели. Если концентрация нужна, то нажмите Close и введите CAL-фактор в соответствующую колонку Acquisition Manager.

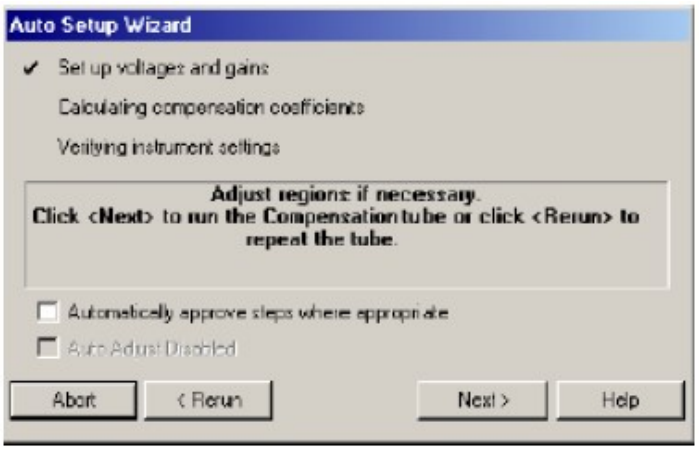
Теперь панель автонастройки запущена.



Приложение автоматически настроит напряжение и усиление на каналах таким образом, чтобы пики Flow-Set попадали в обозначенные регионы, как показано на рисунке.

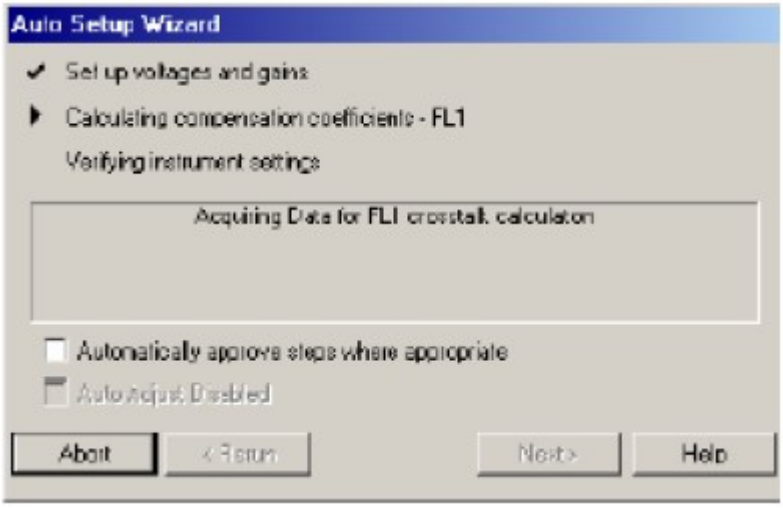


По окончании анализа образца Вы можете перейти к анализу следующего или нажать Rerun для повтора текущего образца, если результат неудовлетворителен. Для повышения качества настройки и удобства рекомендуется выбрать «Auto-Approve steps where appropriate» (при необходимости предпринимать меры по улучшению настроек».

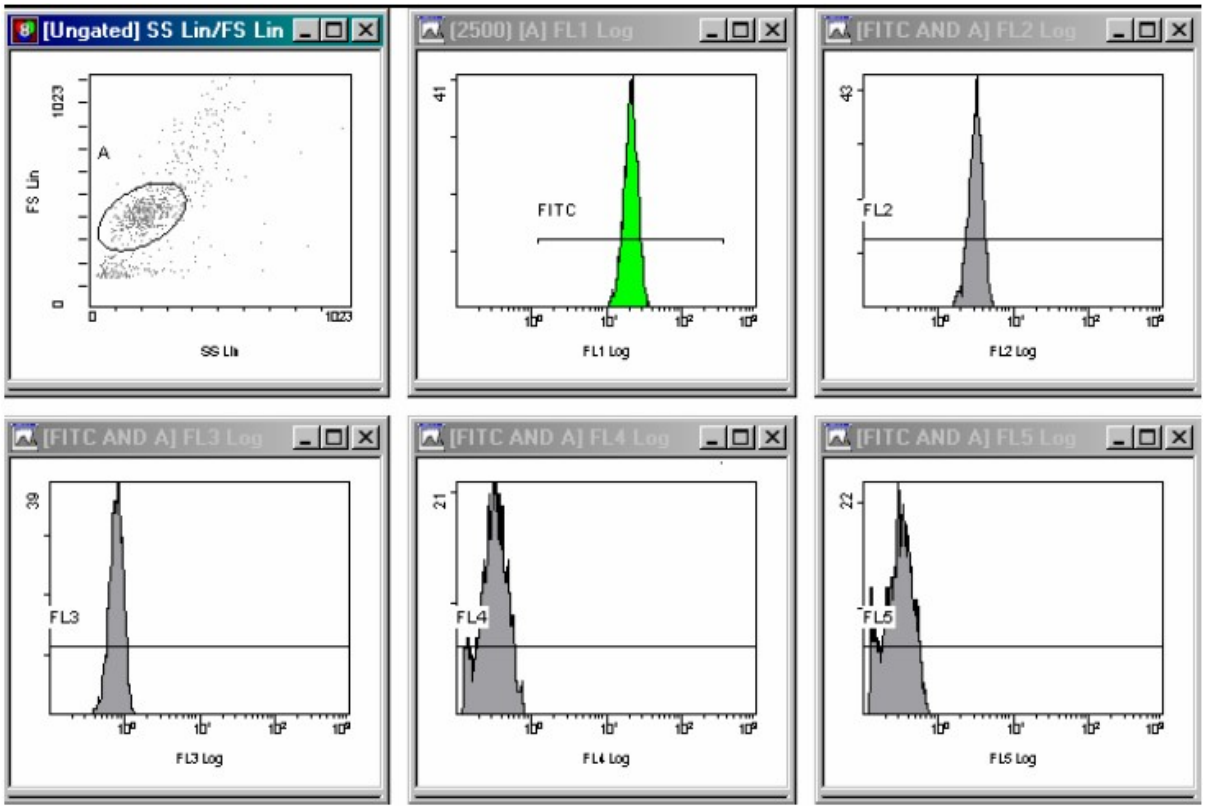


Если результат удовлетворительный нажмите Next для перехода к следующему образцу.

Теперь будет вычисляться цветовая компенсация. Первый образец – лимфоциты, меченные CD45-FITC.



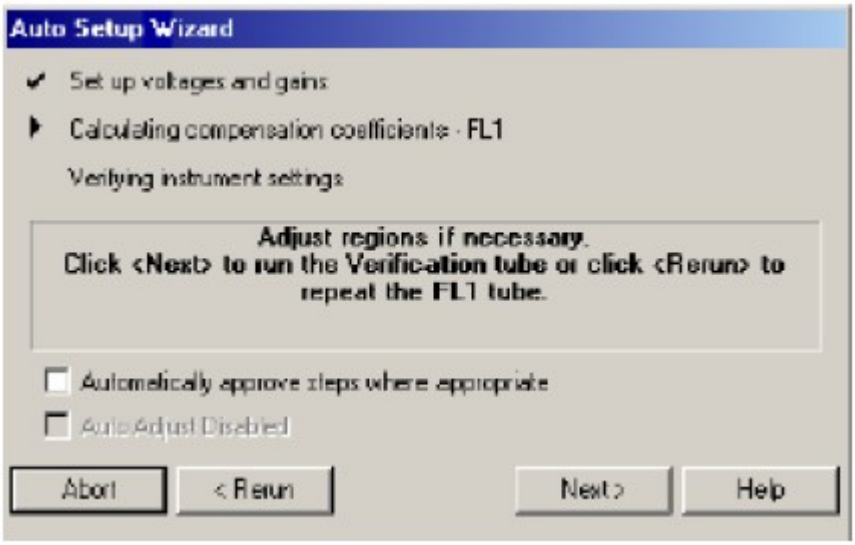
Удостоверьтесь, что облако лимфоцитов попадает в соответствующий гейт на первой гистограмме, а пик CD45-позитивных лимфоцитов в нужный регион, как на рисунке.



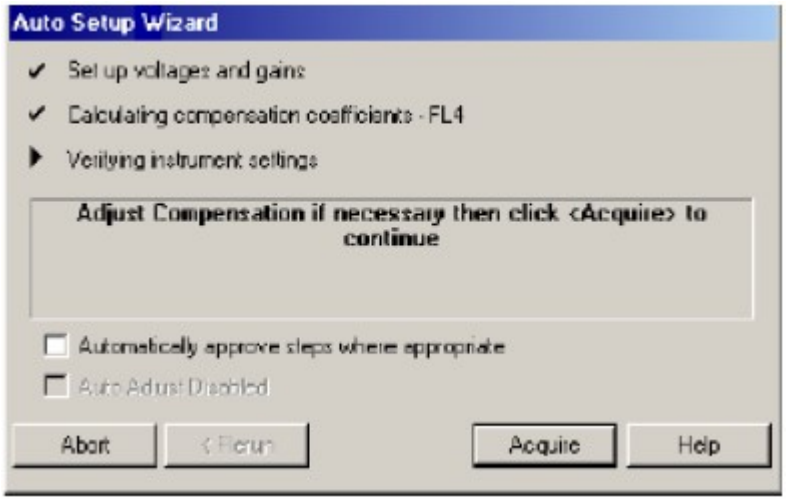
Нажмите Next или Rerun (в зависимости от результата). Выполните исследование для каждой из последующих проб, окрашенных CD45 с разными флуорохромами.

После вычисления цветовой компенсации запускается проверочная пробирка (verification tube) Immuno-Trol CD45/CD4/CD8/CD3. В процессе анализа допускается корректировать настройки при необходимости, для этого нажмите Acquare.

При удовлетворительных результатах нажмите Approve для установки настроек



или Rerun для повтора анализа пробирки.



Замечание. Обратите внимание, что в Acquisition Manager в колонке Cytosettings название импортируемого файла начинается на «verifying». По завершении панели автонастройки файлы Verifying Settings.pro становятся Settings.pro, т.е. Verifying_AS 5C 1L.pro становится AS 5C 1L Settings.

Теперь Вы можете импортировать настроечный файл AS 5C 1L Settings в любой подходящий протокол следующими способами:

- Перетащите свой протокол, который Вы хотите настроить, на рабочее пространство выберите **Cytometer -> Get Cytosettings from Protocol** и выберите файл настроек. Сохраните свой протокол с новыми настройками.
- Перетащите свой протокол, который Вы хотите настроить, в Acquisition Manager и установите в колонке Cytosettings иконку . Нажмите на иконку открыть папку  и выберите файл AS 5C 1L Settings. После запуска образца настроечный файл загрузится в протокол. Сохраните протокол с новыми настройками.

Раздел 17 – Программное обеспечение CXP-Analysis

CXP-Analysis позволяет просматривать ранее сохраненные файлы данных в различных протоколах, корректировать положение регионов и создавать новые регионы и графики, настраивать компенсацию и просматривать множество файлов одновременно. Кроме того, в CXP-Analysis доступны некоторые дополнительные возможности, такие как построение графиков по плотности распределения, контурные и поверхностные графиков, трехмерные томограммы, наложение гистограмм и т.д.

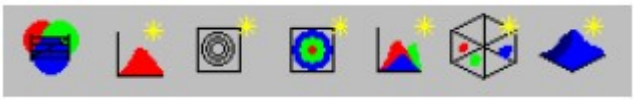
Запуск программы CXP-Analysis

- Сделайте двойной щелчок мышкой по иконке программного обеспечения CXP-Analysis



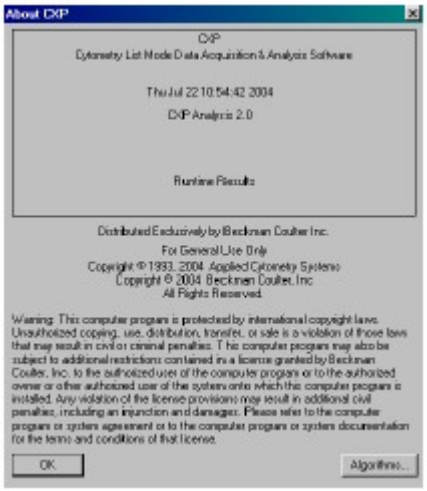
или на рабочем столе Windows Explorer нажмите Start -> Cytomics CXP-Analysis.

- Войдите в программу таким же образом как в CXP-Cytometer.
- Откроется рабочее окно, сходное с CXP-Cytometer, за исключением некоторых иконок на панели инструментов для построения нескольких типов графиков.



Просмотр файла данных в протоколе запуска

Откройте вкладку LMD в Resource Explorer. Выберите нужный файл и перетащите его мышкой на рабочий стол. Файл будет открыт в том протоколе, в котором был записан (Runtime протокол), все гейты будут иметь точно такое же положение как при сборе данных. Чтобы убедиться в том, что данные открыты именно в Runtime протоколе, войдите в Help -> About. В открывшемся окне «About CXP»должен быть статус «Runtime Results».



При удалении региона или других действиях данные будут представляться с учетом этих изменений и в окне «About CXP» статус изменится на «New Protocol».



Воспроизведение файла данных в новом протоколе

Выберите нужный протокол в Resource Explorer во вкладке Protocol и перетащите его на серое поле рабочего стола. Выберите файл данных, который Вы хотите воспроизвести, в Resource Explorer во вкладке LMD и также перетащите его на любой график протокола. Данные файла будут представлены с учетом установки регионов, гейтирования и других условий текущего протокола. При открытии файла таким способом появится предупреждающее сообщение, что параметры данного протокола и файла данных не совпадают. Если Вы нажмете «Continue» (продолжить), то файл откроется с учетом заданных условий. Снова выберите Help -> About и проверьте статус воспроизведения.

Создание мультифайлового протокола

В программном обеспечении CXP Analysis есть возможность просматривать одновременно несколько файлов. Чтобы создать мультифайловый протокол, выполните следующие действия:

1. Перетащите файл данных на рабочий стол.
2. Продублируйте каждый график файла, выделив нужную гистограмму и нажав Ctrl-D или выбрав в меню Plots -> Duplicate. При этом будут создаваться копии графиков данных, но регионы копироваться не будут.
3. Выберите в Resource Explorer следующий файл данных, выделите его щелчком мыши, левой рукой нажмите клавишу Ctrl на клавиатуре, а мышкой перетащите файл на одну из продублированных гистограмм. Если файл перетащить удалось, то в названии графика появится F2.



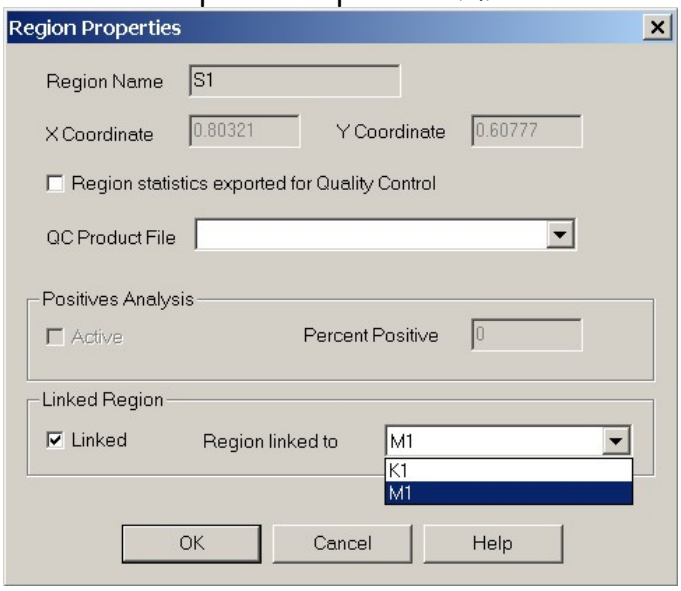


4. Повторите этот процесс для остальных продублированных графиков. В результате Вы должны получить 2 набора графиков. В названиях графиков первого набора будет [F1], второго [F2]. Если необходимо создать протокол более чем для 2-х файлов данных, повторите шаги 1-4 нужное количество раз. Если Вам важно, чтобы положение регионов во всех файлах было таким же, как в одном из контрольных файлов (например, гейтирование по экспрессии CD45 или положение квадрантного региона в файле изотипического контроля), то выполните следующие действия:

а) Скопируйте нужный регион в продублированный график. Для этого щелкните левой клавишей мыши на поле графика, содержащего регион и, не отпуская

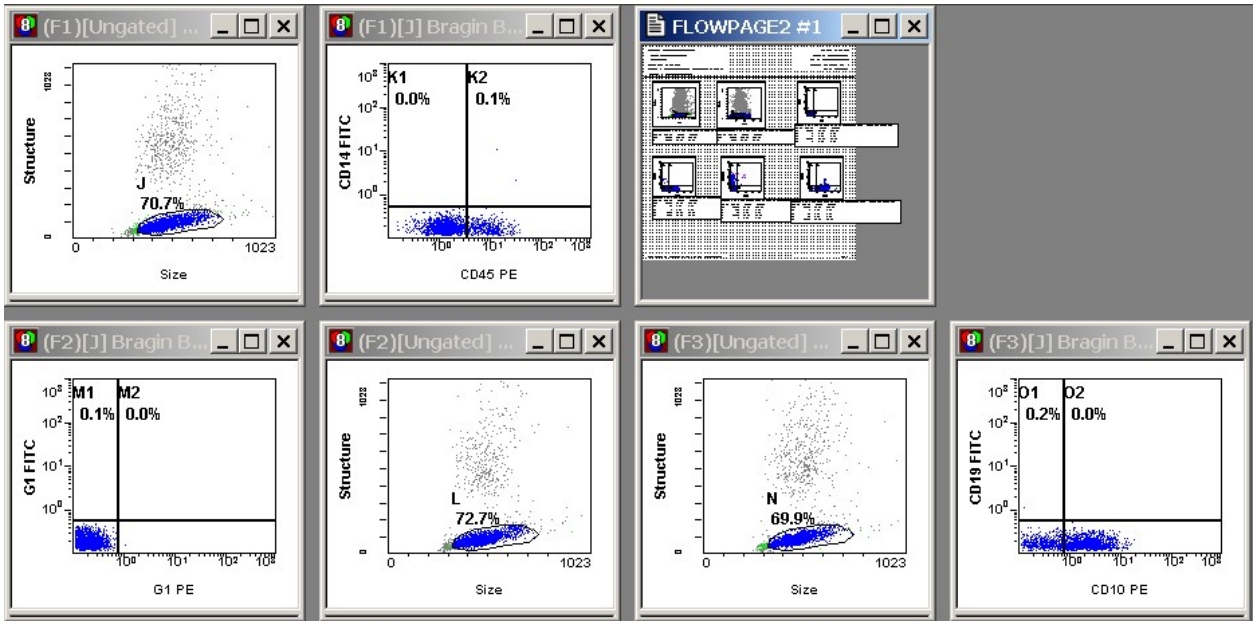
клавиши мыши, перетащите указатель мыши на дублированный график. Или выделите регион щелчком мыши и нажмите Ctrl-C, затем активируйте дублированный график и нажмите Ctrl-V.

б) Сделайте связки между регионами. При установке контрольного региона важно, чтобы изменение его положения отражалось на остальных графиках. Например, квадрантный регион M является контрольным, т.е. выставлен по изотипическому контролю. Квадрантный регион S выставлен на опытной пробе. Чтобы сделать связку между этими регионами откройте свойства региона S, отметьте Linked Region внизу открывшегося окна и выберите имя региона M.



В результате, регион S всегда будет иметь такое же положение, как и M, но не наоборот. Ту же операцию можно проделать с регионом любого типа.

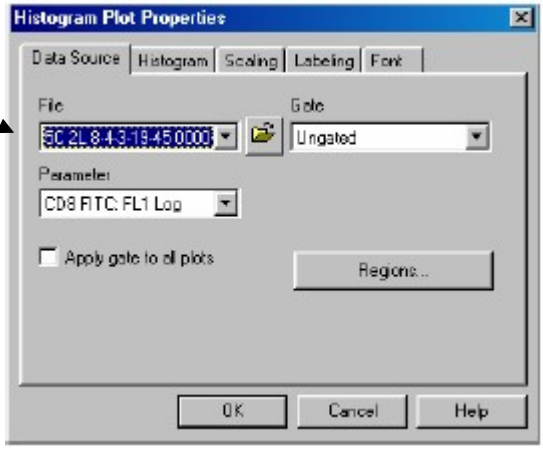
5. Сохраните новый протокол File -> Save Protocol As…
6. Теперь перезагрузите новый протокол. Перетащите файл данных на любой график [F1]. Файл будет загружен на все графики [F1]. Проделайте то же с другим файлом данных и графиком [F2] и т.д.
7. Для протокола можно создать FlowPAGE, где будет отражаться суммарная информация по проанализированным файлам. Это очень удобно при анализе лейкозной панели.



Наложение гистограмм

- Создайте несколько гистограмм с данными из разных файлов.

Для этого можно продублировать одну гистограмму, а затем открыть свойства гистограммы и в строке File выбрать нужный файл данных.



Или перетащите на гистограмму файл данных из Resource Explorer (не забудьте нажать при этом Ctrl, как при создании мультифайлового протокола).

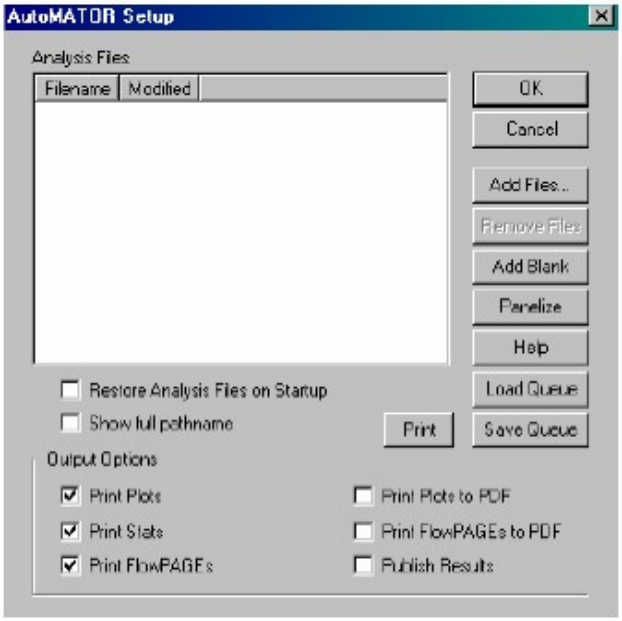
- Нажмите на иконку Overlay  в меню или выберите Plots -> Overlay Plots.
- Перетащите гистограммы в окно Overlay Plot. По умолчанию в этом окне установлен просмотр в виде галереи. Измените вид на наложение  или угловое наложение.

Аналогичным образом можно перетащить файлы гистограмм (*.hst) из Resource Explorer в окно Overlay Plot.

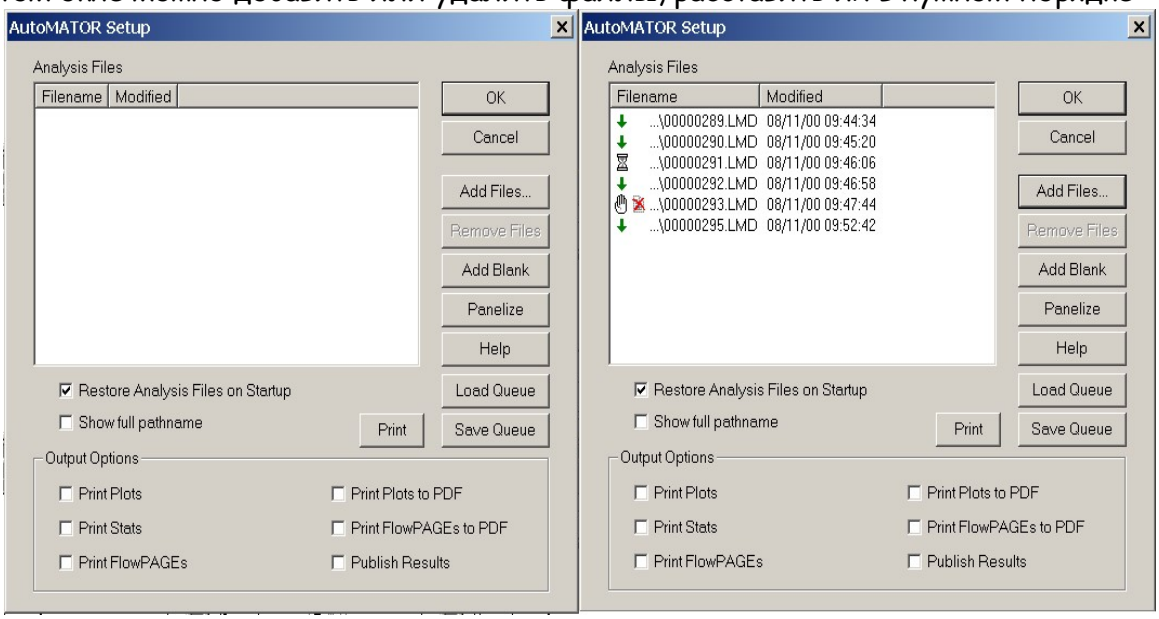
Воспроизведение файлов данных с помощью AutoMATOR

Опция AutoMATOR позволяет выбрать серию файлов для последовательного воспроизведения или одновременного просмотра при мультифайловом анализе.

Откройте протокол, в котором Вы хотите проанализировать файлы. Выберите Tools -> AutoMATOR Setup или нажмите иконку . Откроется окно AutoMATOR Setup.



В этом окне можно добавить или удалить файлы, расставить их в нужном порядке



Знаки в начале каждой строки в списке файлов обозначают режим прокрутки файлов:

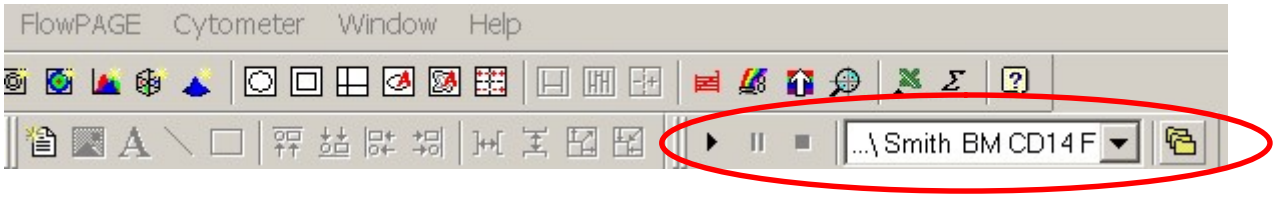
- автоматически воспроизводит файлы один за другим без остановки,

- автоматически воспроизводит файлы с 15 сек паузами,

- файлы воспроизводятся по сигналу оператора.

Чтобы изменить скорость воспроизведения нажмите на значок 1 или 2 раза. Внизу окна можно отметить параметры вывода.

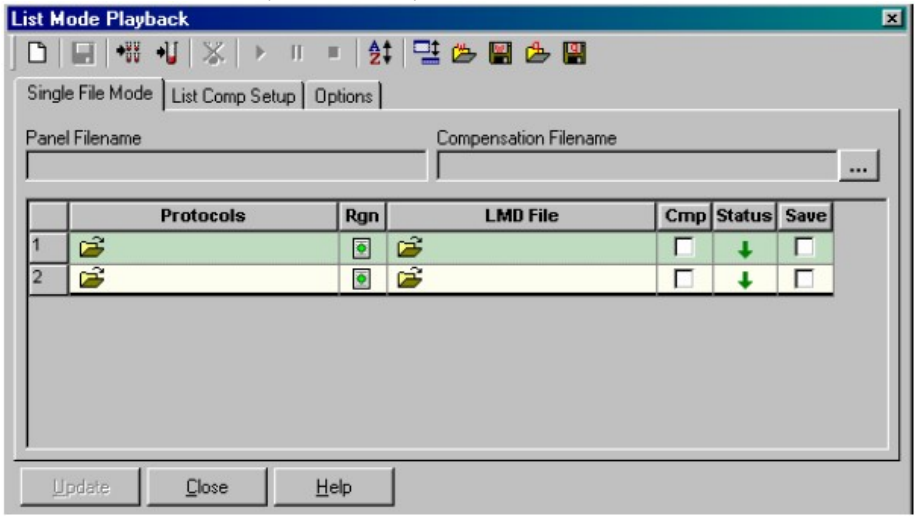
После выбора необходимых параметров и порядка следования файлов нажмите OK. Управляющая панель AutoMATOR вернется в основную панель инструментов:



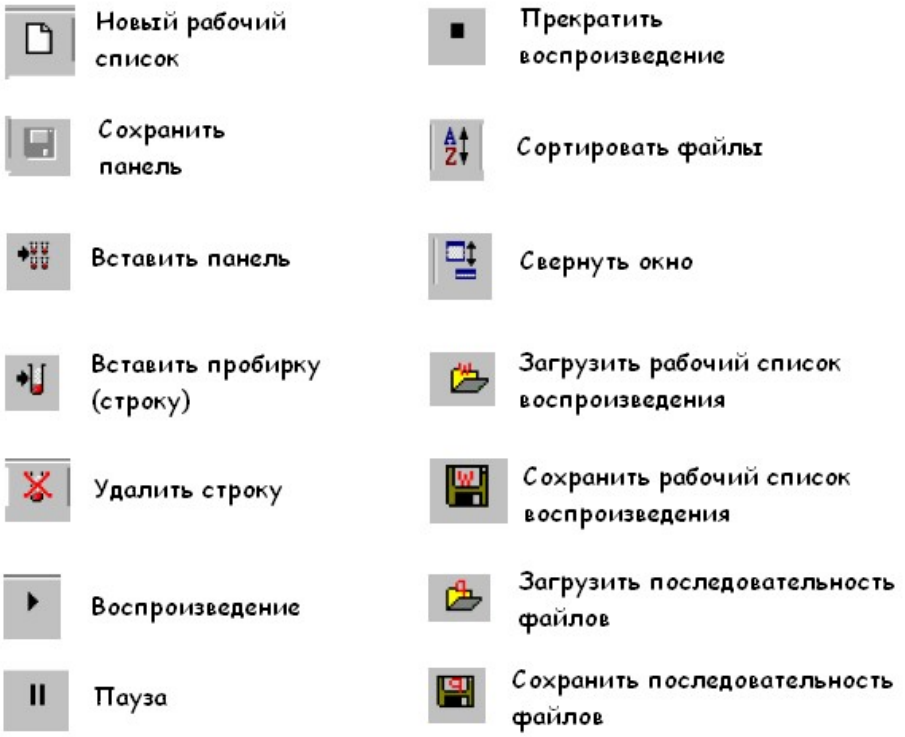
Для запуска воспроизведения файлов нажмите пуск .

Воспроизведение файлов с использованием Listmode Playback

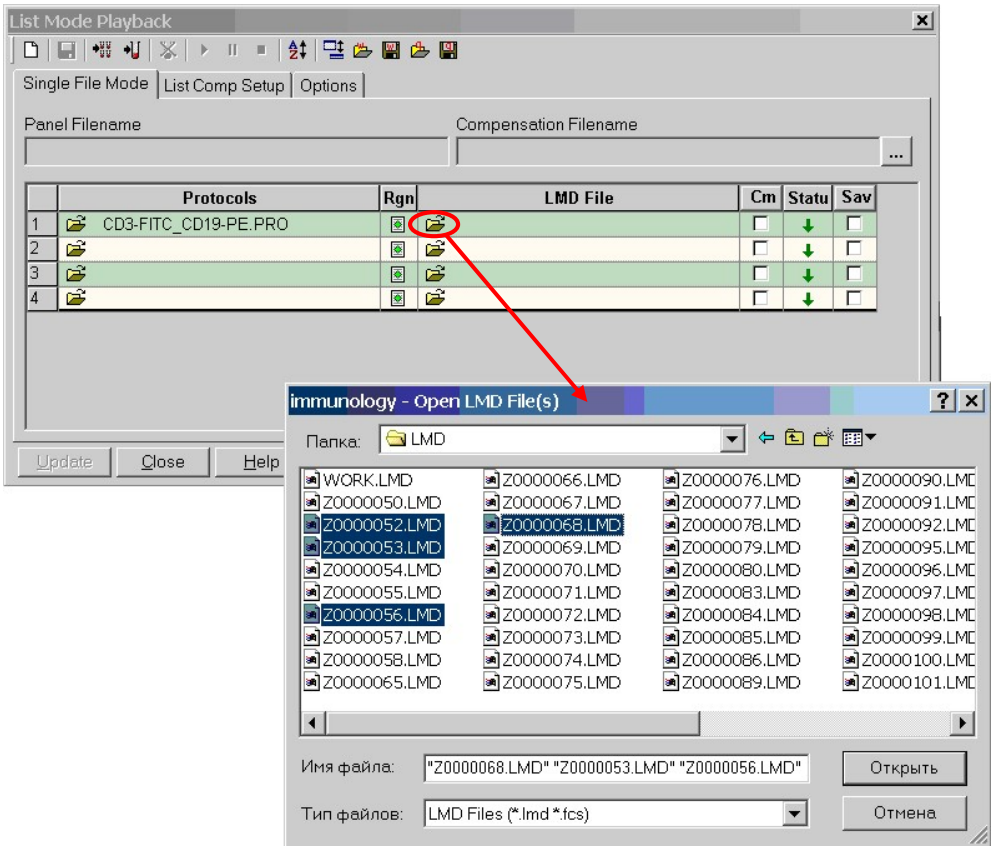
Выберите Tools -> Listmode Playback. Откроется окно:



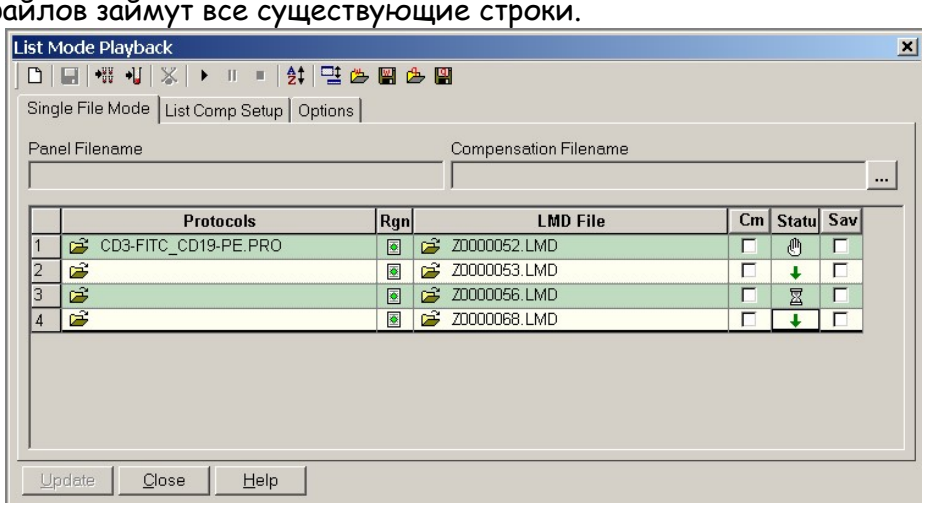
Иконки окна ListMode Playback:



Нажмите иконку «Вставить пробирку (строку)» нужное количество раз. Выберите протокол, в котором будет проводиться анализ, нажав на иконку  в столбце Protocol. Таким же образом выберите файл данных в столбце LMD File. Вы можете выбрать сразу несколько файлов для воспроизведения, обведя их указателем мышки в списке или нажав Ctrl и щелкнув мышью на нужных файлах.



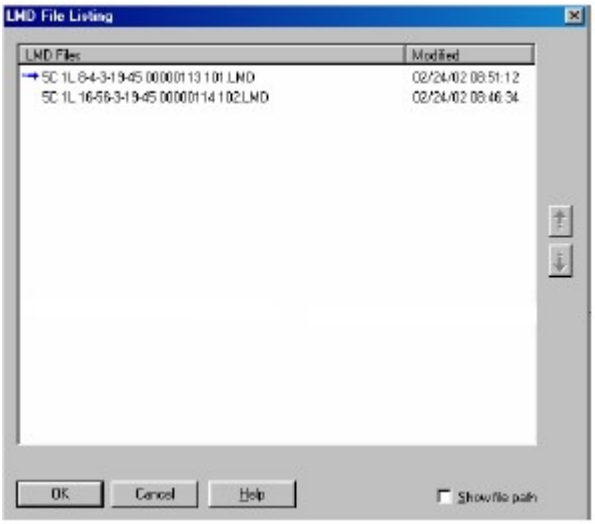
Названия файлов займут все существующие строки.



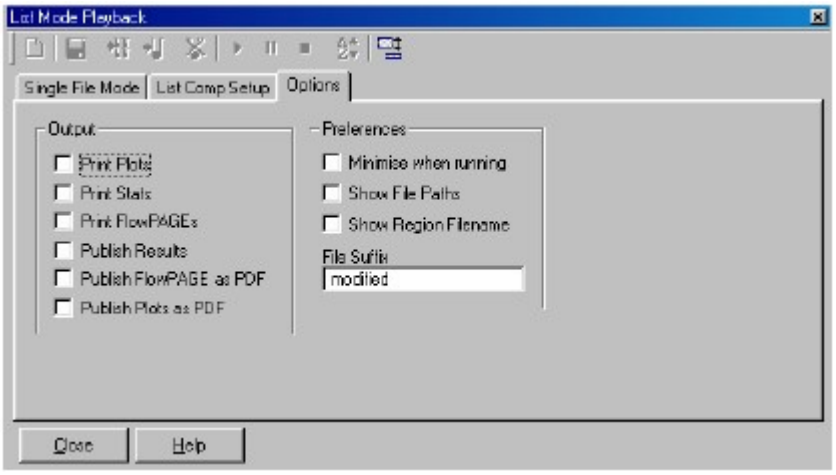
В данном случае все файлы будут воспроизводиться в одном протоколе, однако Вы можете открыть свой протокол для каждого файла.

В столбце Status можно установить скорость воспроизведения также как в AutoMATOR.

Для установки файлов в определенном порядке нажмите иконку сортировки. В открывшемся окне LMD File Listing расставьте файлы в нужном порядке, перетаскивая их мышкой. Нажмите OK, когда закончите.



Нажмите вкладку Options в окне List Mode Playback, чтобы установить параметры вывода.

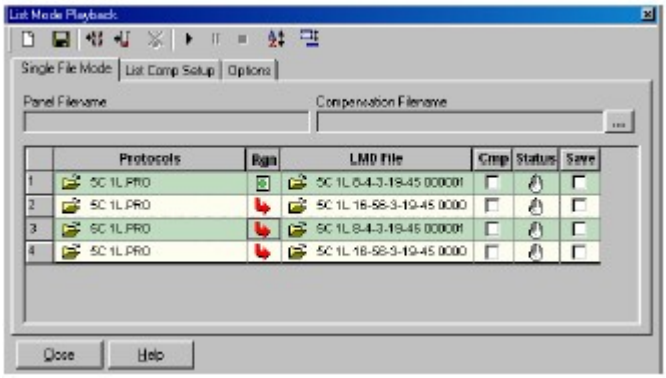


Воспроизведение файлов панели

Файлы можно просматривать в рабочих панелях (файлы *.pnl) или в панелях для анализа, созданных с помощью Listmode Playback (файлы *.ppp).

Создание панели для анализа *.ppp

Откройте окно Listmode Playback (Tools -> Listmode Playback). Очистите список, нажав иконку . Нажмите иконку  несколько раз и откройте нужные протоколы.



В графе Rgn установите способ переноса положения регионов в панели.

Замечание: Разница между красной и синей стрелками

 - передает положение регионов предыдущего протокола

 - передает положение регионов первого протокола

Щелкните правой клавишей мыши по белому или зеленому полю окна и выберите «Save Panel» или нажмите иконку . Присвойте имя панели и нажмите Save.

Выберите файлы для просмотра как описано ранее. Нажмите иконку «Воспроизведение».

Воспроизведение в панели *.ppp или *.pnl

- Очистите список, нажав .
- Нажмите иконку  и выберите имя панели.
- Выберите файлы для просмотра и установите скорость просмотра в колонке Status.
- Нажмите «Старт».

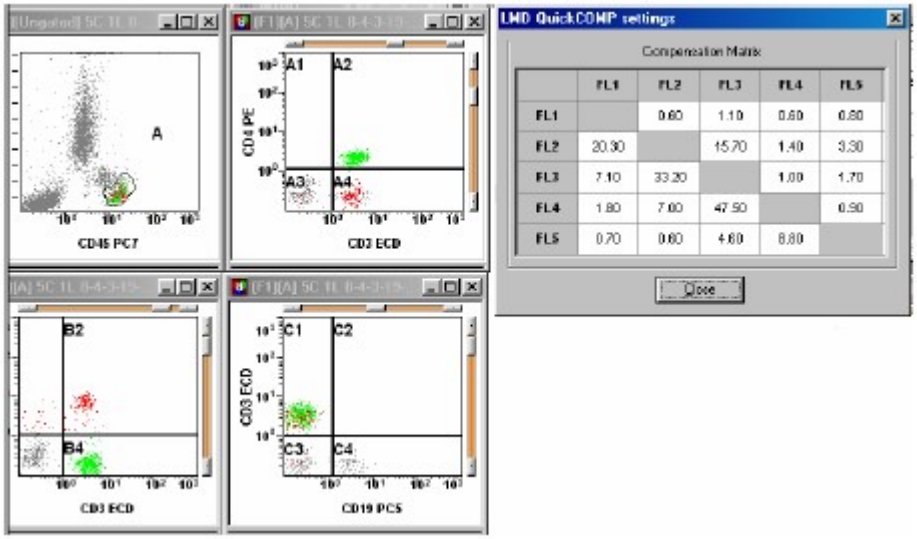
Замечание: Можно загружать только одну панель в окно. Для загрузки следующей панели очистите список.

Коррекция цветовой компенсации

Функция LMD QuickComp

Функция LMD QuickComp позволяет корректировать цветовую компенсацию при воспроизведении файлов.

Откройте файл данных. Выберите в меню Analysis -> LMD QuickComp. На графике появятся оранжевые полоски для настройки компенсации и таблица цветовой компенсации.

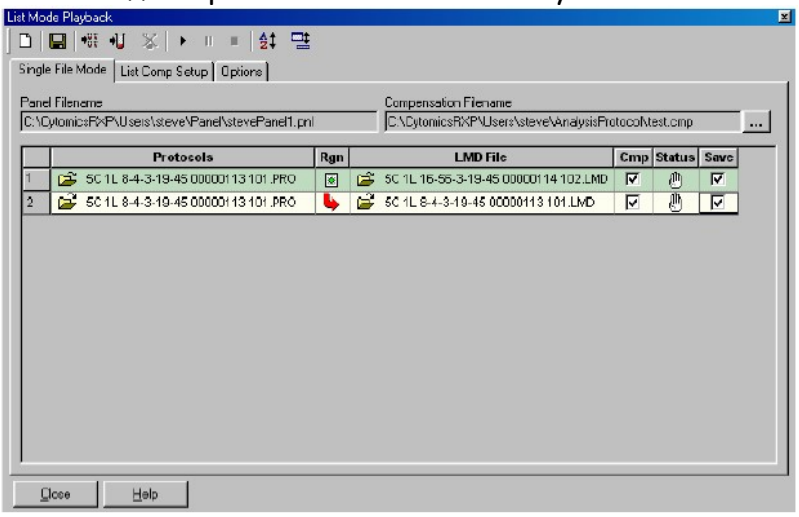


С помощью бегунков на оранжевых полосках Вы можете изменять значения компенсации и сохранить измененный файл, выбрав в меню File -> Save Listmode File as.. Также можно сохранить настройку компенсации в отдельный файл: File -> Save Listmode Compensation As.. В результате будет создан файл *.cmp.

Воспроизведение файла данных с использованием файла *.cmp

Созданный файл *.cmp можно применять к любым файлам данных. Для этого:

- Выберите Tools -> Listmode Playback.
- Выберите вкладку Single File Mode и очистите рабочий список.
- Нажмите иконку «Добавить панель» и выберите нужную панель.
- Загрузите файлы данных для воспроизведения.
- Установите режим переноса регионов и скорость воспроизведения в колонках Rgn и Status.
- Отметьте щелчком мыши в колонке Cmp использование файла компенсаций.
- Выберите файл *.cmp в строке Compensation Filename, нажав многоточие в конце строки.
- Отметьте щелчком мыши в колонке Save сохранение полученного файла данных после применения файла компенсаций. К имени файла будет присоединяться суффикс, чтобы имя файла отличалось от исходного. Суффикс можно указать во вкладке Options окна List Mode Playback.



- Нажмите кнопку «Старт» во вкладке Single File Mode, чтобы запустить воспроизведение файлов.
- Измененные и сохраненные файлы *.lmd появятся в Resource Explorer.

Копирование графиков в другие приложения Windows

Например, как скопировать график в приложение Microsoft PowerPoint.

- Щелкните правой клавишей мыши на график и выберите Copy Plot image.
- Откройте Microsoft PowerPoint.
- Щелкните правой клавишей мыши на пустую страницу Microsoft PowerPoint и выберите «Вставить/Paste».

Представление результатов в формате Microsoft Excel

В меню выберите File -> Workspace Preferences и откройте вкладку Tab. Выберите нужный формат данных (текстовый файл или Excel). Нажмите OK.

Формат представления данных, отмеченный в Workspace Preferences, будет применяться ко всем файлам LMD.

Если файл данных открыт, нажмите иконку  или выберите Tools -> Publish Result Now. Все данные статистики будут представлены в формате Excel.

Приложение 1. Действия оператора при сообщениях об ошибках работы цитометра

Сообщение	Причина	Действие
Cleanse Level Error	Низкий уровень жидкости Cleanz	Долейте Cleanz в контейнер
	Ошибка появляется при нормальном уровне жидкости	Обратитесь в сервисную службу
Cleanse Level Warning	Низкий уровень жидкости Cleanz	Долейте Cleanz в контейнер
	Ошибка появляется при нормальном уровне жидкости	Обратитесь в сервисную службу
Data Rate Warning	Скорость сбора данных превышает 6000 кл/сек	1. Разведите образец или измените установку дискриминатора 2. Убедитесь, что крышка контейнера с обжимающей жидкостью плотно закрыта
Data Stream Warning	Ошибка аппаратных средств сбора данных	1. Перезагрузите компьютер и снова запустите цитометр 2. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
Host Command Invalid	Программное обеспечение не может выполнить команду компьютера	1. Перезагрузите компьютер и снова запустите цитометр 2. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
Laser Current Level	Значение силы тока лазера вне пределов допустимых значений	Обратитесь в сервисную службу
Laser Power Level	Значение напряжения на лазере вне пределов допустимых значений	Обратитесь в сервисную службу
Laser Regulation Warning	Колебания напряжения лазера	Обратитесь в сервисную службу
Laser Start Error	Лазер не включается в течение 120 секунд	1. Выключите и снова включите прибор. 2. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
MCL Carousel In/Out Error	Карусель не движется по команде программного обеспечения	1. Проверьте, нет ли препятствий движению карусели (например, застрявшая пробирка) 2. Проверьте показания давления в системе на блоке питания прибора (должно быть около 30 psi) 3. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
MCL Carousel Label Error	Не считывается штрих-код карусели	1. Проверьте, нет ли повреждений штрих-кода 2. Попробуйте использовать другую карусель 3. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
MCL Carousel Rotate Error	Движение карусели не соответствует командам	1. Проверьте, нет ли препятствий движению карусели (например, застрявшая пробирка) 2. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
MCL CPU Error	Ошибка аппаратных средств карусели	Обратитесь в сервисную службу
MCL Door Open Error/Warning	Произошло открытие двери во время работы карусели	Закройте дверь карусели
MCL EPROM Warning	Ошибка аппаратных средств	Обратитесь в сервисную службу

	карусели	
MCL Error	Ошибка аппаратных средств карусели	Обратитесь в сервисную службу
MCL Parallel Resv/Send Error	Ошибка связи с каруселью	Обратитесь в сервисную службу
MCL Probe Up/Down Error	Карусель движется неполный круг	Проверьте индикаторы карусели на панели блока питания. Посмотрите последовательность действий в CXP-Help, Reset the Circuit Breakers
	Пробоподъемник не движется	Обратитесь в сервисную службу
MCL Program Load Error	Ошибка аппаратных средств карусели	Обратитесь в сервисную службу
MCL RAM Error	Ошибка аппаратных средств карусели	Обратитесь в сервисную службу
MCL Rec from Fault Error	Ошибка связи с каруселью	Обратитесь в сервисную службу
MCL Receive Timeout Error	Ошибка связи с каруселью	Обратитесь в сервисную службу
MCL Request Error	Ошибка связи цитометра с каруселью	1. Выключите и снова включите прибор 2. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
MCL Serial 1/2 Resv/Send Error	Ошибка связи с каруселью	Обратитесь в сервисную службу
MCL Transmit Timeout Error	Ошибка связи с каруселью	Обратитесь в сервисную службу
MCL Tube Displaced Error	Неправильное положение пробирки в карусели	Обратитесь в сервисную службу
MCL Tube Jam Error	Застревание пробирки в карусели	Обратитесь в сервисную службу
MCL Tube Load Error	Плохой контакт между пробоподьемником и пробиркой	Перелейте образец в другую пробирку
MCL Tube Position Error	Карусель не поворачивается в нужное положение или ошибка считывания позиций карусели	Обратитесь в сервисную службу
MCL Tube Up/Down Error	Образец не поднимется или не спускается	1. Убедитесь, что метка на пробирке не залипает на стенки карусели 2. Проверьте целостность пробирки 3. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
Sample Pressure Error	Возможна утечка из-за повреждения головки пробозаборника или дефекта пробирки	Проверьте головку пробозаборника. Если требуется ее замена, обратитесь в сервисную службу.
Sensors Stream Warning	Ошибка связи аппаратных средств забора образца и программного обеспечения цитометра	1. Перезагрузите компьютер и снова запустите цитометр 2. Если проблема не устранилась, обратитесь в сервисную службу
Sheath Drawer Error	Проводник обжимающей жидкости (трубка) не плотно прикреплена к резервуару	Закрепите трубку
Sheath Level Error	Недостаточный уровень обжимающей жидкости	Долейте обжимающую жидкость в контейнер

Sheath Level Warning	Оставшегося количества обжимающей жидкости хватит на 5 минут работы с образцом	Долейте обжимающую жидкость в контейнер
	Ошибка появляется при нормальном уровне жидкости	Обратитесь в сервисную службу
Sheath Pressure Error	Давление в системе обжимающей жидкости вне допустимого интервала значений	Плотнее закрутите крышки контейнеров с обжимающей и промывающей жидкостями. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
State Machine Failure	Ошибка загрузки программного обеспечения	1. Выключите и снова включите прибор 2. Если проблему устранить не удалось, обратитесь в сервисную службу
System Pressure Error	Нет соединения линий давления между блоком питания и прибором	Соедините линии давления
	Давление в системе вне допустимого интервала	1. Проверьте показания датчика давления на панели блока питания при состоянии прибора «Awaiting Sample» 2. Запустите анализ образца и наблюдайте за давлением. Если давление в системе ниже указанного в разделе 1, обратитесь в сервисную службу.
System Vacuum Error	Жидкость в вакуумной ловушке	Если вакуумная ловушка заполнена жидкостью более чем на $\frac{1}{4}$, очистите ее.
	Нет соединения вакуумных линий между блоком питания и прибором	Соедините вакуумные линии
	Аппаратные проблемы	Обратитесь в сервисную службу
Temperature Error	Температура внутри цитометра выше 50 ^0C	Очистите воздушные фильтры или обратитесь в сервисную службу
Temperature Sensor Failure	Неисправен датчик температуры	Обратитесь в сервисную службу
Temperature Warning	Температура внутри цитометра выше 50 ^0C	Очистите воздушные фильтры или обратитесь в сервисную службу
Transputer 1|2 Error	Ошибка программного обеспечения	Выключите и снова включите компьютер
Transputer Link Error/Warning	Ошибка соединения компьютера и цитометра	Обратитесь в сервисную службу
Vacuum Chamber Warning	Много жидкости в вакуумной системе	Выполните промывку вакуумных линий с помощью адаптеров
Waste Backpressure Error	Проблема с фильтром контейнера для слива	Обратитесь в сервисную службу
Waste Level Error	Контейнер для слива переполнен	Вылейте содержимое контейнера
Waste Level Warning	Через 5 минут контейнер для слива будет переполнен	Вылейте содержимое контейнера
	Ошибка появляется при пустом контейнере	Обратитесь в сервисную службу

Приложение 2. Иконки панели инструментов CXP

Опции File


Открыть файл LMD


Сохранить файл FCS


Сохранить протокол


Печать


Вырезать


Копировать


Вставка


Отменить последнее действие


Вернуть

Опции регионов


Вставить цветной точечный график


Вставить гистограмму


Вставить контурный график


Вставить график распределения плотности событий


Выполнить наложение графиков


Томограмма


Вставить поверхностный график


Вставить Prism график


Легенда графика

Гейты, цвет, статистики и помощь


Создать/изменить гейты


Изменить смешивание цветов


Изменить доминирование цветов


Посмотреть текущий регион


Создать версию результатов в формате Excel


Корректировать таблицу статистик


Помощь

Acquisition Manager


Очистить рабочий список


Открыть файл рабочего списка


Сохранить рабочий список


Сохранить панель


Удалить строку


Вставить тест (протокол)


Вставить панель


Корректировать состав таблицы Acquisition Manager


Печатать рабочий список




Вставить сторонний рабочий список

Опции графиков


Полигональный регион


Прямоугольный регион


Квадрантный регион


Эллипсоидный автогейт

Контурный автогейт

Редактировать двойной делитель

Линейный регион

Множественный линейный регион

Редактировать делитель

Инструменты генератора отчетов

Отчет контроля качества

Шаблон отчета по панели

Отчет по панели

Вход в базу данных

Управление данными

Редактор продукта

Таблица ежедневной проверки прибора

Инструменты

Опции FlowPAGE


Вставить новую FlowPAGE


Вставить bitmap


Аннотации


Нарисовать линию


Нарисовать прямоугольник


Выровнять сверху


Выровнять снизу


Выровнять слева


Выровнять справа






Увеличить


Уменьшить

Опции наложения графиков


Просмотр в виде галереи


Просмотр в виде наложения


3-мерное изображение наложения


Легенда наложения


Статистика наложения


Добавить график


Открыть гистограмму


Аннотация


Связанные маркеры


Несвязанные маркеры


Вращать по часовой стрелке


Вращать против часовой стрелки

Опции цитометра


Возобновить сбор данных


Начать сбор данных


Приостановить сбор данных


Приостановить и перемешать пробирку


Прекратить сбор данных и сохранить


Прекратить сбор данных без сохранения


Режим пробирки с фиксированной позицией (№10)


Ручной режим карусели


Автопромывка вакуумных линий


Цикл промывки


Цикл промывки проточной ячейки


Холостой режим работы прибора


Окно управления цитометром (Cytometer control)

Опции AutoMATOR


Открыть окно AutoMATOR


Воспроизведение

Пауза

Остановить

Опции ListMode Playback

Создать новый рабочий список

Сохранить панель

Добавить панель

Добавить протокол

Удалить протокол

Сортировать рабочий список

Минимизировать окно Playback

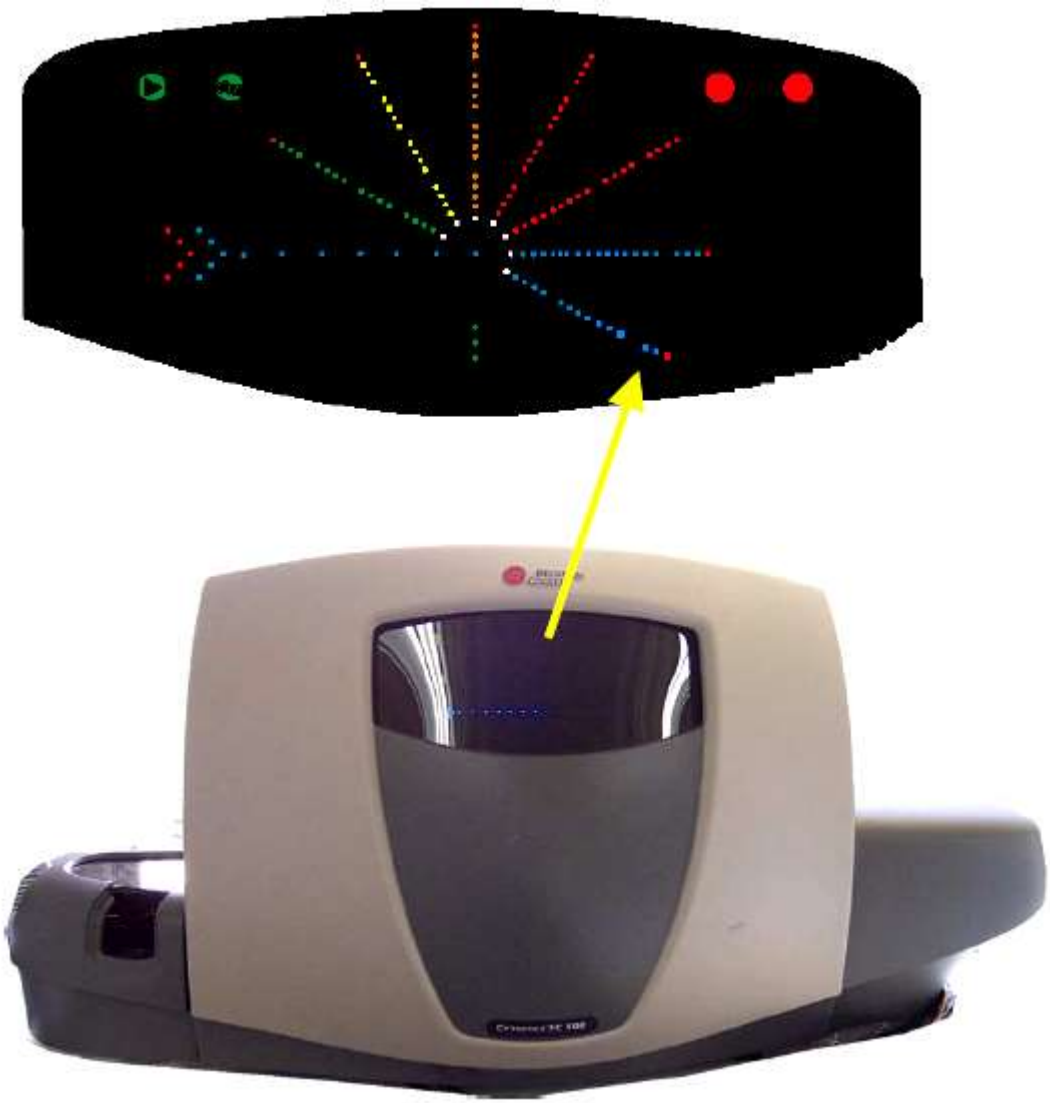
Загрузить рабочий список

Сохранить рабочий список

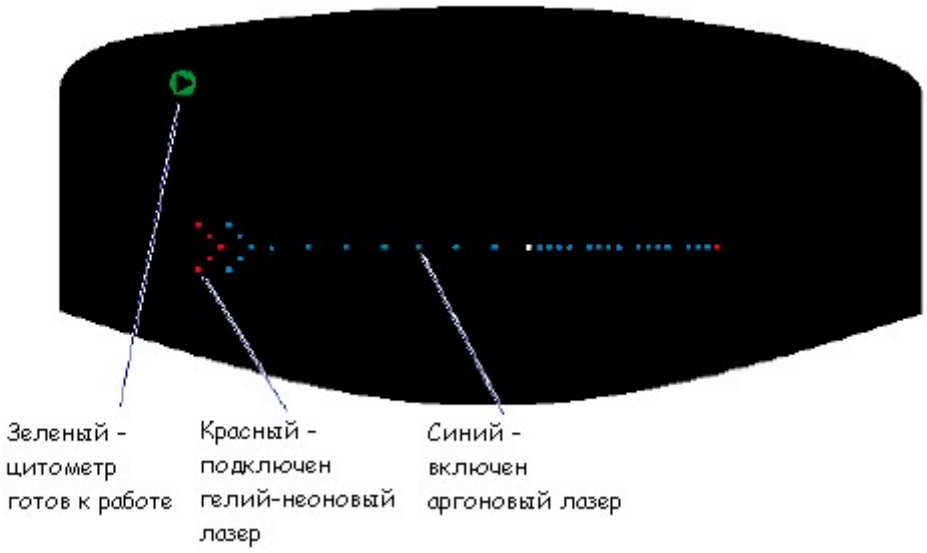
Загрузить последовательность файлов

Сохранить последовательность файлов

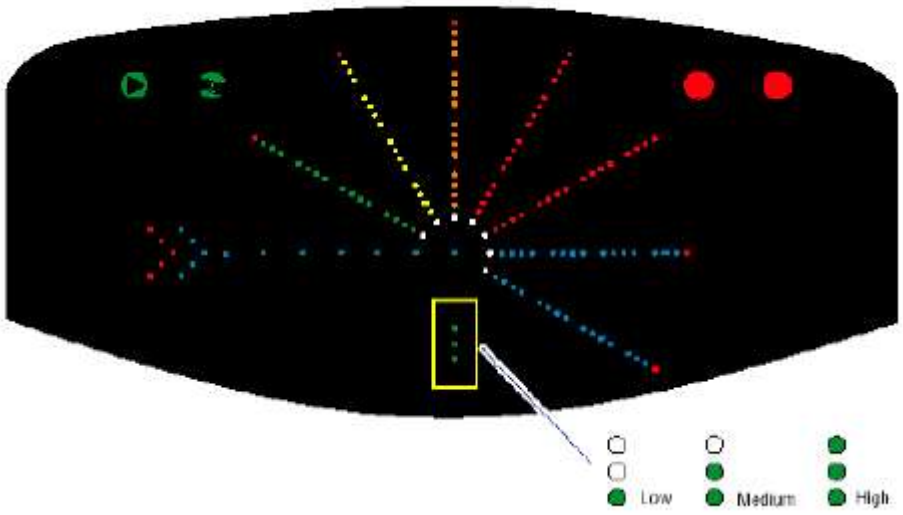
Приложение 3. Дисплей цитометра и сообщения об ошибках



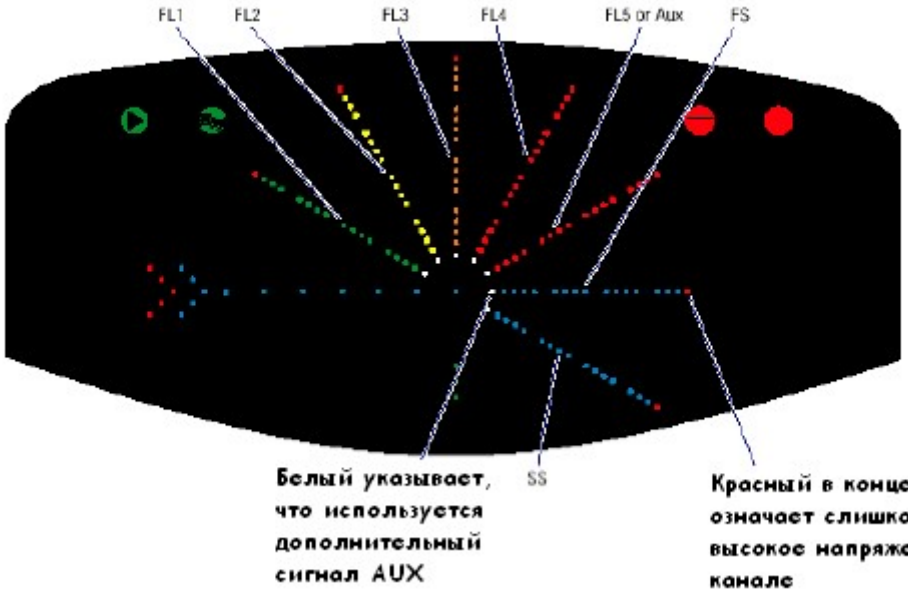
Индикаторы готовности цитометра и включения лазера



Индикатор скорости тока образца



Индикаторы амплитуды сигнала



Индикаторы уровня и тока жидкостей

