



Pracovní instrukce

Název útvaru, kde jsou pořizovány řízené výtisky:	Ústav imunologie	Výtisk č.: 2 (číslo řízeného výtisku na útvaru)
Držitel řízeného výtisku:	Anna Špidlová	

Pracovní instrukce 2.0.11: Obsluha průtokového cytometru Coulter Epics XL

Účel instrukce: Návod na spuštění průtokového cytometru Coulter Epics XL, příprava na měření, akvizice, ukončení práce, vypnutí a údržba a přístroje.

Požadavky na systém:

- software Coulter Epics XL ver. 1.5 („starý“ software), který se otevře po spuštění přístroje automaticky
- software Coulter Epics XL System II ver. 1.5
- pracovní stanice Coulter Epics XL

Pracovní roztoky:

- Hemosol, izotonický ředící roztok pro hematologické analyzátory (užíváme místo originálního nosného roztoku)
- Coulter Clenz Cleaning Agent – čistící roztok
- desinfekční roztok do odpadní nádrže (Savo)

Pracovní roztoky jsou uloženy v lednici v laboratoři buněčné imunity (lab. č. 1) a v komorové lednici (příjem materiálu IMUNO).

Spotřební materiál:

- 2 x 75 mm polystyrénové zkumavky pro průtokovou cytometrii (BD Falcon nebo BD Trucount)

Upozornění před spuštěním přístroje:

- Přístroj se spouští přímo, není třeba předem startovat fluidní systém.
- Většinu měření provádíme v software Coulter Epics XL ver. 1.5 („starý“ software), který se otevře po spuštění přístroje automaticky.
- Zkumavky vkládané do cytometru nesmí být popraskané (dojde k porušení vakua, přístroj poškozenou zkumavku nepřijme).
- Kontrolky pro stav roztoků (Level Sense) jsou umístěny na cytometru v prostoru pro vkládání vzorků nad kontrolkou „RUN“, jsou označeny „Sheat low“ (pro nosný „flow“ roztok), „Cleanse low“ (pro čistící roztok) a v případě nízké hladiny těchto roztoků svítí červeně – hned po spuštění přístroje. Pokud dojde ke spotřebování roztoků během měření, objeví se navíc červeně nápis v pravém rohu obrazovky. V obou případech je třeba provést doplnění roztoků.

I. Postup spuštění, akvizice a ukončení práce na průtokovém cytometru Coulter Epics XL

1. Zkontrolujeme stav nosného (flow) a čistícího roztoku: Otevřeme pravou spodní zásuvku cytometru pro roztoky, v případě potřeby roztoky doplníme – menší nádrž vlevo je pro čistící roztok (Coulter Clenz Cleaning Agent), větší vpravo pro „flow“ (nosná tekutina, používáme Hemosol, izotonický ředící roztok pro

Dokument je majetkem FNO a je zakázáno informace v něm předávat mimo nemocnici.



hematologické analyzátoři) roztok. Nádrže po doplnění řádně zašroubujeme a zavřeme zásuvku cytometru. Zásobní roztoky jsou umístěny v laboratoři v lednici nebo v komorové lednici. Roztoky je možno v případě potřeby doplnit i během měření – přístroj signalizuje nízkou hladinu roztoků (červeně, v pravém dolním rohu obrazovky), přístroj automaticky odpojí vakuový systém a je možno provést doplnění obvyklým způsobem – viz údržba průtokového cytometru Coulter Epics XL.

2. Zapneme počítač tlačítkem „Power“, pokud chceme výsledky tisknout, zapneme i tiskárnu (všechny komponenty systému mimo tiskárnu jsou navzájem propojeny). Automaticky se otevře používaný software, v levém spodním rohu obrazovky se objeví nápis „Cytometer Startup“, na cytometru nahoře svítí zeleně „ON“ (kontrolka pro laser). Tato fáze trvá přibližně 15 minut. Analýzu provádíme ve výběru „Application“- „Acquisition“.
3. Během přípravy cytometru vybereme z databáze protokol: Vybereme položku „Protocol“, šipkou najedeme na příslušný protokol a potvrdíme „Select“. Z obrazovky vpravo nahoře opišeme do sešitu číslo posledního měření z předešlého dne.
4. Před „naběhnutím“ cytometru se objeví na obrazovce vlevo dole nápis „Run Initialization“, v prostoru pro zkumavky sjede dolů zkumavka s čistícím roztokem a nahoře na cytometru se zeleně rozsvítí „Ready“ (kontrolka pro cytometr, nahoře nad kontrolkou pro laser). Na obrazovce vlevo dole se objeví nápis „Insert Sample Tube“, v prostoru pro vkládání zkumavek svítí zeleně „Flow“ a „Run“. Cytometr je připraven pro analýzu vzorků.
5. Do prostoru pro vkládání vzorků vložíme zkumavku se vzorkem (speciální nepoškozené zkumavky pro průtokovou cytometrii).
6. Zkumavka automaticky vyjede nahoru, na obrazovce vlevo dole se zobrazí „Sample Tube Detected“, pak „Acquiring Data“, „Run“ svítí oranžově. Na obrazovce sledujeme počet zhodnocených buněk (běžné vzorky hodnotíme na 5000 buněk), čas a průtok buněk komůrkou.
7. V prvním histogramu (FS-SS, přiblížíme jej kliknutím myši) zkontrolujeme, případně upravíme rozložení jednotlivých populací a „gate“ vyšetřované populace buněk (nejčastěji lymfocyty). Úpravu rozložení provádíme pomocí tlačítek pro signál (úprava voltáže pro jednotlivé detektory), kompenzace barev (minimalizujeme překrývání jednotlivých fluorescencí) a nastavení diskriminantu (odstranění nečistot a buněčné drti). Úpravu „gate“ provedeme najetím myši na okraj ohraničení a posunutím. Při většině běžných vyšetření je aktivována funkce „Autogate“, kdy dojde k automatickému ohraničení sledované populace buněk, ale i v tomto případě je třeba „gate“ vizuálně zkontrolovat.
8. Postupně zkontrolujeme další histogramy (pro jednotlivé fluorescence), případně provedeme úpravu ohraničení pro měřené fluorescence.
9. Po akvizici požadovaného (nebo předem nastaveného) počtu buněk analýzu ukončíme. Klepneme na tlačítko „Stop“, zkumavka sjede dolů a objeví se tabulka, kde napíšeme identifikaci vzorku, potvrdíme a výsledek se automaticky vytiskne a uloží do databáze. Pokud nepotřebujeme výsledky ukládat v databázi, klepneme na tlačítko „Abort“, zkumavka sjede dolů a výsledek opišeme na žádanku (v tomto případě nemusí být zapnutá tiskárna).
10. Po objevení nápisu na obrazovce vlevo dole „Insert Sample Tube“ můžeme pokračovat v měření dalšího vzorku (buď na stejném protokolu nebo vybereme protokol jiný).

Dokument je majetkem FNO a je zakázáno informace v něm předávat mimo nemocnici.



11. Po analýze vzorků opíšeme do sešitu číslo posledního měření (na obrazovce vpravo nahoře), vyjme z kumavku , z protokolu nevyjíždíme.
12. Zmáčkne tlačítko „Cleanse“ umístěné v prostoru pro vkládání zkumavek pod tlačítkem „Prime“ , toto se rozsvítí zeleně, na obrazovce vlevo dole se objeví nápis „Cytometer Cleanse Cycle“ a čekáme. Čištění probíhá automaticky.
13. Vlevo dole na obrazovce se objeví „Cytometer Verification“ a potom „Cytometer Ready“ , bliká zeleně kontrolka „Run“ a „flow“.
14. Do prostoru pro vkládání vzorků vložíme zkumavku s čistícím roztokem a tlačítkem „Power“ vypneme počítač (tím i cytometr). Zkumavka s čistícím roztokem vyjede v prostoru pro vkládání vzorků nahoru.

Upozornění k údržbě přístroje :

- Dojde-li během měření k ucpání či znečištění průtokové komůrky (špatné rozložení buněčných populací, nízká průtoková rychlost), zmáčkne při měření (zkumavka se vzorkem je vložena v prostoru pro vzorky a probíhá akvizice) tlačítko „Prime“ umístěné na cytometru v prostoru pro vkládání vzorků pod tlačítkem „Run“ a čekáme.
- Pokud se tímto způsobem komůrka nezprůchodní, provedeme čištění tímto způsobem:
Na obrazovce najedeme na políčko „Application“ – „Listmode“, vložíme speciální zkumavku s čistícím roztokem a čekáme (podle potřeby roztok ve zkumavce doplňujeme).

Pozor: Čištění musíme provádět v „Listmode“, nikdy v „Acquisition“, protože by došlo k poškození zařízení pro vkládání vzorků – čistící zkumavka nesmí vyjet nahoru!

- Chceme-li se po ukončení práce (po proběhnutí „Cleanse Cycle“) z nějakého důvodu vrátit zpět k měření, zmáčkne tlačítko „Run“ v prostoru pro vkládání vzorků (místo „Power“ na počítači) a čekáme, dokud se neobjeví hlášení „Insert Sample Tube“. Konečné čištění po další analýze musíme samozřejmě provést znovu.

Nepodaří-li se nám vyčištění průtokové komůrky ani druhým popsaným způsobem, je nutno zavolat servis.

Kompletní návod k obsluze přístroje, údržbě a řešení problémů – viz originální manuál k přístroji (laboratoř č. 1).

II. Použití software Coulter Epics XL System II ver. 1.5 pro měření

Pokud chceme pro měření použít Software Coulter Epics XL System II ver. 1, postupujeme takto:

1. V nabídce „Application“ zvolíme „Exit“, zobrazí se okénko „Are you sure about exiting to DOS“, vybereme „Y“ a potvrdíme.
2. Napíšeme „xl2“, potvrdíme.
3. Do okénka „Enter institution name“ napíšeme „imunologie“, do okénka „enter cytometer serial number“ napíšeme „epicsxl“ a do okénka „enter Operator ID“ napíšeme „id“.
4. Otevře se software Coulter Epics XL Systém II a měříme obvyklým způsobem.
5. Do software Coulter Epics XL ver. 1.0 se dostaneme opět přes „Application“-„Exit“, potvrzení „Y“, napsání „xl“ a potvrzení.

Upozornění: Ooperační systém nerozlišuje velká a malá písmena.



III. Údržba průtokového cytometru Coulter Epics XL

Základní údržba přístroje vyžaduje

- Doplnění a kontrolu provozních roztoků
- Vyprazdňování a čištění odpadní nádrže
- Promytí cytometru po měření, v případě potřeby během měření
- Vyčištění systému čistícím roztokem
- Čištění filtrů

Doplňování a kontrola provozních roztoků:

Nádrže pro provozní roztoky jsou umístěny v zásuvce v dolní části cytometru. Menší nádrž vlevo je pro čistící roztok (Coulter Clenz Cleaning Agent - modrý), větší vpravo pro nosný, „flow“ roztok (používáme Hemosol, izotonický ředící roztok pro hematologické analyzátory).

Zásobní roztoky jsou umístěny v laboratoři v lednici a v komorové lednici na příjmu materiálu IMUNO. Doplnění roztoků lze provádět před měřením (kontrola a případné doplnění před spuštěním cytometru), ale systém je konstruován tak, že předpokládá doplnění během měření (systém senzorů). V tomto případě se v levém dolním rohu obrazovky objeví informace (červeně) o nízkém stavu některé tekutiny, vakuový systém se automaticky odpojí, otevřeme zásuvku (při měření zásuvku nelze otevřít, musí se odpojit vakuový systém), odšroubujeme zátky a doplníme tekutiny. Po doplnění nádrže řádně zašroubujeme a zásuvku dobře zavřeme.

Upozornění:

- Při manipulaci se zásuvkou musíme dávat pozor, aby nedošlo k poškození gumových hadiček.
- Rostoky doplňujeme opatrně (používáme kádinku, případně nálevku), aby nedocházelo zbytečně k potřísnění vnitřku zásuvky (koroze, usazování solí). Pokud dojde k vylití některého roztoku do vnitřku zásuvky nebo k potřísnění láhve, tekutiny ze všech částí zásuvky a láhve pečlivě vytřeme.

Vyprazdňování a čištění odpadní láhve:

Všechny biologické vzorky a veškeré materiály, které s nimi přijdou do styku, mohou přenášet smrtelně nebezpečná onemocnění. Bezpečnostní opatření jsou stanovena v samostatném dokumentu identifikovaném v Příručce jakosti. Manipulace s biologickým materiálem se řídí celoustavním metodickým pokynem MP-L012-07.

Před likvidací obsahu odpadní nádoby ošetříme její obsah přidáním desinfekčního prostředku (5% chlornan sodný, např. Savo - 10% z celkového objemu). Odpad likvidujeme v souladu s místními předpisy. Dodržujeme příslušná bezpečnostní opatření (vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice, brýle).

Odpadní láhev je umístěna na pravé boční stěně zdroje. Opatrně odšroubujeme zátku se senzorem, nádobu vytáhneme z držáku a po přidání desinfekčního prostředku vyprázdníme a dobře vypláchneme. Do prázdné nádoby přidáme desinfekční prostředek, nádobu umístíme do držáku a jen mírně zašroubujeme (při úplném zašroubování by mohlo dojít k nasátí obsahu odpadní láhve do fluidního systému přístroje). Odpadní láhev udržujeme v čistotě, při manipulaci používáme ochranný oděv a ochranné prostředky a při případném potřísnění provedeme dekontaminaci.



Každodenní údržba cytometru:

Po ukončení práce na průtokovém cytometru zvolíme čistící cyklus, čištění a promytí přístroje proběhne automaticky:

1. Z prostoru pro vkládání vzorků odstraníme zkumavku.
2. Zmáčkne tlačítko „Cleanse“, umístěné v prostoru pro vkládání zkumavek pod tlačítkem „Prime“, toto se rozsvítí zeleně, na obrazovce vlevo dole se objeví nápis „Cytometer Cleanse Cycle“ a čekáme. Čištění probíhá automaticky.
3. Vlevo dole na obrazovce se objeví „Cytometer Verification“ a potom „Cytometer Ready“, bliká zeleně kontrolka „Run“ a „flow“.
4. Do prostoru pro vkládání vzorků vložíme zkumavku s čistícím roztokem a tlačítkem „Power“ vypneme počítač (tím i cytometr). Zkumavka s čistícím roztokem vyjede v prostoru pro vkládání vzorků nahoru.

Čištění průtokové komůrky během měření:

Průtokovou komůrku můžeme v případě potřeby (špatné rozložení buněčných populací, nízká průtoková rychlost) vyčistit i během měření, čištění proběhne automaticky a nedojde ke znehodnocení měřeného vzorku:

1. Při měření (zkumavka se vzorkem je vložena v prostoru pro vzorky a probíhá akvizice, tzn. zkumavka je „nahoře“) zmáčkne tlačítko „Prime“ umístěné na cytometru v prostoru pro vkládání vzorku pod tlačítkem „Run“.
2. Čekáme, proběhne automaticky čistící cyklus, po jeho proběhnutí automaticky pokračuje akvizice vzorku. Zkontrolujeme rozložení populací a průtokovou rychlost.
3. V případě úpravy rozložení populací a průtokové rychlosti pokračujeme v měření, pokud nedošlo k řádnému vyčištění průtokové komůrky, lze celý postup čištění několikrát zopakovat.

Někdy se může stát, že popsané automatické čištění během akvizice vzorku není úspěšné (nemá cenu cyklus „Prime“ opakovat víc než 5x, problém je vážnější a musíme provést důkladnější čištění), potom zvolíme vyčištění systému čistícím roztokem.

Vyčištění systému čistícím roztokem:

Pozor: Tento druh čištění musíme provádět v „Listmode“, nikdy v „Acquisition“, protože by došlo k poškození zařízení pro vkládání vzorků – čistící zkumavka nesmí vyjet nahoru.

1. Z prostoru pro vkládání vzorků vyjmeme zkumavku s analyzovaným vzorkem.
2. Na obrazovce zvolíme „Application“ – „Listmode“.
3. Do prostoru pro vkládání vzorků vložíme speciální zkumavku s čistícím roztokem (Coulter Clenz Cleaning Agent) a čekáme (cyklus proběhne automaticky, pouze podle potřeby roztok ve zkumavce doplňujeme).
4. Po proběhlém cyklu zkontrolujeme akvizici vzorku, v případě úspěšného čištění v měření pokračujeme.
5. Pokud nedošlo k odstranění problému (předběžně to poznáme už v průběhu automatického čistícího cyklu podle toho, že nedochází k úbytku čistícího roztoku ve speciální zkumavce, tzn. systém je stále neprůchodný), voláme servis.

Čištění filtrů průtokového cytometru Coulter Epics XL:

Filtry k zadržování prachu kontrolujeme a čistíme dle potřeby (podle prašnosti prostředí).

V případě zanešení prachem dochází ke špatné ventilaci a nežádoucímu přehřívání přístroje.

Dokument je majetkem FNO a je zakázáno informace v něm předávat mimo nemocnici.



Průtokový cytometr je vybaven senzory pro optimální provozní teplotu a v případě, že dojde k jejímu překročení, dojde nejdříve k varování (červený informační text v pravém dolním rohu obrazovky přístroje) a v případě ignorování hlášení dojde k automatickému vypnutí přístroje.

Filtry k zadržování prachu jsou umístěny v prostoru zdroje (1 filtr, v horní části dvířek po otevření) a v prostoru vlastního cytometru (2 filtry, vzadu dole vlevo a vpravo, přístupné, nevyžadují demontáž přístroje).

Při čištění filtrů musí být průtokový cytometr vypnutý, nikdy nečistíme ani jinak nemanipulujeme s přístrojem za provozu.

Filtry jsou z molitanu a jsou uloženy za krytkou z umělé hmoty. Krytku opatrně vyjmeme (jen tlakem, nemusíme nic odšroubovávat) a vytáhneme molitan. Molitan vyčistíme (podle stupně znečištění buď vyprášíme nebo vypereme ve vodě se saponátem a usušíme). Krytku a spodní část, na které je uložen molitan, vytřeme a dobře vysušíme. Po vyčištění (případně usušení) molitanu vrátíme tyto části zpět a překryjeme krytkou. Krytky musí být dobře usazené, jinak při provozu přístroje dochází k rezonanci (není na závadu pro provoz přístroje, ale přispívá k vyšší hlučnosti zařízení). V tomto případě (po vypnutí přístroje) musíme filtry a krytky znovu pečlivě vložit a přesně a pečlivě usadit.

Čištění vakuové pumpy:

Čištění vakuové pumpy je potřeba provést v případě, že dojde k poklesu vakua (není možná akvizice vzorku, systém hlásí chybu ve vakuovém systému).

Poznámka: V případě chyby vakuového systému kontrolujeme nejdříve „jednodušší“ věci:

- neporušenost zkumavek
- zavření zásuvky s provozními tekutinami, utažení zátky nádrží s provozními tekutinami
- kontakty, těsnost systému pro vkládání vzorků (přitlačíme ručně zkumavku, pokud ji systém „vezme“, může být špatné těsnění systému pro vkládání vzorků; v tomto případě je třeba těsnění vyměnit – voláme servis, nachystané vzorky nouzově doměříme přitlačováním zkumavky)

Po zkontrolování systému, pokud nedošlo k odstranění chyby ve vakuovém systému, provedeme zkontrolování a vyčištění vakuové pumpy:

Vakuová pumpa (VAC TRAP) je uložena ve zdrojové jednotce, v horní části mezi vakuovým filtrem (VAC FILTER) a vodní pumpou (WATER TRAP). Může se stát, že dojde k nalepení pohyblivé části pumpy (vysrážení roztoku) a tím k nesprávné funkci pumpy.

Vakuovou pumpu opatrně vytáhneme ze závěsu, odšroubujeme skleněnou nádržku a vypláchneme vodou. Potom nádržku našroubujeme zpět a zavěsíme na své místo.

Poznámky:

Průtokový cytometr Coulter Epics XI používáme pro měření vzorků pro výzkum a výuku. Slouží jako záložní přístroj v případě havárie průtokového cytometru BD FACSCanto pro změření vzorků z běžného rutinního provozu.

Literatura:

Manuál k přístroji



1. vydání a revize

Revize

V případě návrhu změn tohoto dokumentu kontaktujte zpracovatele.

Revizi provádí zaměstnanec určený představitelem vedení pro jakost.

Výsledek revize v případě, že nastane, nebo nenastane změna:

Do sloupce „Výsledek revize“ popis změny (minimálně číslo strany a kapitoly, kde změna nastala, nebo „viz kurzíva“) dne:.....“ . Sloupce „Zpracoval“ „Schválil“ vyplnit .

	Zpracoval	Přezkoumal a schválil
1. vydání	RNDr. Marta Ordeltová <i>Ordeltová</i>	MUDr. Zuzana Heřmanová <i>Heřmanová</i>
Výsledek revize – beze změny (+ datum revize), popis změn (stanovení nové účinnosti)		