

**CYTO-STAT
tetraCHROME
CD45-FITC/CD4-RD1/
CD8-ECD/CD3-PC5**

REF 6607013 - 50 тестов

**CYTO-STAT
tetraCHROME
CD45-FITC/CD56-RD1/
CD19-ECD/CD3-PC5**

REF 6607073 - 50 тестов

Ч.№ 4238068-KE



| | CD45-FITC | CD4-RD1 | CD8-ECD | CD3-PC5 | CD56-RD1 | CD19-ECD |
|------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| Специфичность | CD45 | CD4 | CD8 | CD3 | CD56 | CD19 |
| Клон | B3821F4A | SFC112T4D11 | SFC121Thy2D3 | UCHT1 | N901/NKH-1 | J3-119 |
| Гибридома | NS-1 x BALB/c | NS-1 x BALB/c | NS-1 x BALB/c | NS-1 x BALB/c | NS-1 x BALB/c | NS-1 x BALB/c |
| Иммуноген | Трансфектант, содержащий кДНК человеческого CD45 | Человеческие периферийные Т-лимфоциты | Человеческие тимоциты | Человеческие лимфоциты и лимфоциты периферической крови от пациента с синдромом Сезари | Человеческие клетки хронической миелоидной лейкемии | Клетки лимфомы SKLY 18 |
| подкласс Ig | IgG2b | IgG1 | IgG1 | IgG1 | IgG1 | IgG1 |
| Вид | Мышь | Мышь | Мышь | Мышь | Мышь | Мышь |
| Источник | Асцитная жидкость | Кондиционированная среда | Кондиционированная среда | Кондиционированная среда | Асцитная жидкость | Кондиционированная среда |
| Очистка | Аффинная хроматография | Аффинная хроматография | Аффинная хроматография | Аффинная хроматография | Аффинная хроматография | Аффинная хроматография |
| Флуоресценция | Возбуждение при 468-509 nm Излучение при 504-541 nm | Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 568-590 nm | Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 610-635 nm | Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 660-680 nm | Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 568-590 nm | Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 610-635 nm |
| Конъюгат | FITC (изотиоцианат флуоресцеина) | RD1 (Фикоэритрин) | ECD (Фикоэритрин-Texas Red-X) | PC5 (Фикоэритрин-Cy5) | RD1 (Фикоэритрин) | ECD (Фикоэритрин-Texas Red-X) |
| Молярная концентрация | FITC/Белок: 3-10 | RD1/Белок: 0,5-1,5 | ECD/Белок: 0,5-1,5 | PC5/Белок: 0,5-1,5 | RD1/Белок: 0,5-1,5 | ECD/Белок: 0,5-1,5 |

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА



НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/ CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/ CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 предназначены для использования в проточных цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL, Cytomics FC 500, или эквивалентных им, либо с системой tetraONE SYSTEM для систем проточной цитометрии COULTER EPICS XL/XL-MCL. Системы tetraONE SYSTEM и tetraCXP SYSTEM включают в себя реагенты моноклональных антител для четырехцветной флуоресценции, реагенты контроля качества, дополнительно поставляемый реагент для определения абсолютных значений, а также программное обеспечение для автоматизированного анализа популяций лимфоцитов в цельной крови с использованием систем проточной цитометрии XL/XL-MCL с программным обеспечением SYSTEM II или систем проточной цитометрии FC 500 с программным обеспечением CXP. Эти реагенты, используемые отдельно или в сочетании с автоматизированными системами, предназначены только для диагностики *in vitro* и позволяют одновременно определить методом проточной цитометрии процентное содержание и абсолютные значения следующих клеток: CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+ и/или CD3+, CD19+ и CD3-/CD56+. ^{1,2,3} Эти системы также вычисляют отношение CD4/CD8 при использовании CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, и общее процентное содержание лимфоцитов при использовании CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5.

Об использовании этих реагентов с указанными системами см. в руководстве по эксплуатации системы tetraONE SYSTEM (Ч.№ 4237293) или системы tetraCXP SYSTEM (Ч.№ 177416).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов в периферической крови человека включает клетки трех типов: Т-клетки (образующиеся в вилочковой железе), В-клетки (образующиеся в костном мозге), и NK (натуральные

киллеры).⁴ Морфология этих клеток неразличима при микроскопии, однако клетки различаются по антигенным характеристикам своих клеточных мембран.

Т-лимфоциты, В-лимфоциты и NK играют основную роль в работе иммунной системы. Разные подтипы Т-лимфоцитов могут распознавать специфические антигены, выполнять эффекторные функции и/или контролировать тип и интенсивность клеточного и/или гуморального иммунного ответа. В результате активации антигенами или макрофагами через Т-лимфоциты, специфические В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые вырабатывают и секретируют специфические иммуноглобулины (Ig). NK представляют собой отдельную популяцию лимфоцитов; они являются цитолитическими эффекторами и выполняют интегрирующую функцию в регуляции гемопоэза, выполняя функцию защиты от вирусных инфекций и разрушают клетки злокачественных опухолей. Вызываемая NK цитолитическая активность не ограничивается антигенами главных комплексов гистосовместимости (ГТКС) I или II класса.⁴

В прошлом определение и подсчет Т- и В-лимфоцитов выполнялись с помощью таких клеточных маркеров, как рецепторы бараньих эритроцитов на Т-лимфоцитах (Е-розетка) и Ig на поверхностной мембране В-лимфоцитов.^{5,6} Метод Е-розетки специфичен для определения Т-лимфоцитов, однако он ограничен, поскольку предоставляет возможность только визуального определения и ручного подсчета комплексов бараньих эритроцитов с Т-лимфоцитами при световой микроскопии. Измерение Ig на поверхностной мембране для определения и подсчета В-лимфоцитов также имеет ограничения, поскольку другие популяции клеток могут иметь аналогичные Ig на поверхностной мембране и/или связывать Ig через рецепторы к Fc-фрагменту молекулы IgG, что приводит к получению недостоверных результатов. Для определения и подсчета NK традиционно используются стандартные реакции цитотоксичности, такие как тест с радиоактивным хромом⁷ или проба на гемолитические бляшки.⁸

Позднее для определения и подсчета Т-, В- и NK-лимфоцитов были разработаны моноклональные антитела.^{6,9,10} В сравнении с относительно

неспецифичными поликлональными антителами, вырабатываемыми к этим клеточным популяциям, моноклональные антитела определяют специфичные поверхностные антигены Т-клеток, В-клеток и NK-клеток. Этим достигается более точное и воспроизводимое измерение количества лимфоцитов и определение стадий дифференцировки Т- и В-клеток при использовании в сочетании с другими клеточными маркерами (TdT, HLA-D-связанный антиген, Ig поверхностной мембраны).

Появление или исчезновение клеточных поверхностных антигенов Т- и В-лимфоцитов отражает стадию созревания (дифференцировки) и/или функциональное состояние клеток. После появления один или все данные антигены могут экспрессироваться одной и той же клеткой в течение различных периодов времени.

Экспрессия всех поверхностных антигенов Т-лимфоцитов осуществляется в следующей последовательности: CD7 (ранний протимоцит); CD2 (средний протимоцит); CD5 (незрелый тимокит), цитоплазматический CD3 (незрелый и промежуточный тимокит) и CD3 (зрелый тимокит).^{3,9} Далее следует совместная экспрессия (промежуточный тимокит) и раздельная экспрессия (зрелый тимокит) клеточных поверхностных антигенов CD4 (индуцирующийся) и CD8 (супрессорный/цитотоксический).^{3,9} После экспрессии антигены CD7, CD2, CD5 и CD3, а также CD4 или CD8 экспрессируются совместно на протяжении оставшегося периода дифференцировки Т-лимфоцитов, включая неактивированные и активированные зрелые Т-лимфоциты периферической крови и лимфоидной ткани.

Экспрессия всех поверхностных антигенов В-лимфоцитов осуществляется в следующей последовательности: CD19 (коммитированный предшественник В-клеток/пре-пре-В-клетка); CD20 (ранний предшественник В-клеток).^{3,9,11} После экспрессии антигены CD19 и CD20 экспрессируются совместно на протяжении оставшегося периода дифференцировки В-лимфоцитов (в том числе на неактивированных и активированных зрелых В-лимфоцитах периферической крови и лимфоидной ткани). Оба антигена исчезают на последней стадии дифференцировки В-лимфоцита (плазматической клетки).

CD21 (неактивированные зрелые В-лимфоциты периферической крови и лимфоидной ткани) и CD22 (предшественники В-клеток) представляют собой временные поверхностные антигены В-клеток, которые исчезают во время активации В-лимфоцитов периферической крови и лимфоидной ткани.^{3,11} Поверхностная экспрессия CD22 предшествует экспрессии цитоплазматического CD22 (пре-пре-В-клетка).

Показано, что NK развиваются из предшественников в костном мозге и могут полностью дифференцироваться в нем без воздействия вилочковой железы.¹⁰

Реагенты моноклональных антител, специфичные ко всем поверхностным антигенам Т-клеток, В-клеток или NK-клеток, можно использовать для определения и подсчета зрелых Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов или NK-клеток соответственно. Реагент моноклональных антител, специфичный для конкретного клеточного поверхностного антигена, можно также использовать для определения зрелости (степени дифференцировки) и/или функционального состояния популяции лимфоцитов В данном тесте моноклональные антитела CD3, CD56 и CD45 используются для определения и подсчета в периферической крови поверхностных антигенов зрелых Т-клеток, индуцирующих Т-клеток, супрессорных/цитотоксических Т-, В- и NK-клеток (CD3, CD4, CD8, CD19 и CD56 соответственно). Этот тест позволяет одновременно определять разные популяции лимфоцитов.

CD45

Антитела CD45 распознают все лейкоцитарные антигены семейства CD45 с молекулярным весом 180, 190, 210 и 220 kd.^{3,12,13} Эти антигены известны также, как общий антиген лейкоцитов (LCA). Антиген CD45 экспрессируется на всех типах кровяных клеток, кроме зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников.^{14,15} Он не определяется в дифференцированной некроветворной ткани.^{14,15,16,17}

CD3

Антитела к антигену CD3 специфичны для эписилона-цепи состоящего из пяти цепей CD3-компонента комплекса TCR.^{3,18} Молекулярный вес этой цепи составляет 20 kd.¹⁸ Этот антиген специфичен для всей линии Т-клеток; обычно он присутствует на поверхности зрелых тимоцитов, а также незрелых и активированных Т-лимфоцитов периферической крови, как индуцирующей, так и супрессорной/цитотоксической популяции.^{19,20,21}

CD4

Молекулярный вес антигена CD4 составляет 62 kd.^{3,22} Он присутствует на тимоцитах и индуцирующих Т-лимфоцитах периферической крови.^{22,23} В небольших количествах он также экспрессируется на моноцитах.²⁴ Лимфоциты CD4+ играют основную роль в регуляции иммунного ответа.^{25,26} В периферической крови лимфоциты CD4+ выполняют индуцирующую функцию при взаимодействии между Т- и Т-клетками, Т- и В-клетками, а также Т-клетками и макрофагами.²⁴ Антиген CD4 реагирует с антигеном главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса II на клетках-мишенях.^{22,27}

CD8

Молекулярный вес антигена CD8 составляет 68 kd.^{22,28} Обычно он присутствует примерно на 80% моноцитов и 30-35% Т-лимфоцитов периферической крови, а также на некоторых натуральных киллерах.^{22,29,30} Благодаря супрессорной и цитотоксическому действию лимфоциты CD8+ играют центральную роль в регуляции иммунного ответа.^{25,26,27} Антиген CD8 реагирует с антигеном

главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I на клетках-мишенях.^{19,24}

CD19

Антиген CD19 экспрессируется на всех типах В-клеток, включая ранние предшественники В-клеток.³ Антиген CD19 представляет собой мембранный гликопротеин с молекулярным весом 95 kd.¹ Экспрессия CD19 продолжается на всех стадиях созревания и прекращается только на конечной стадии дифференцировки в плазматические клетки.^{1,31} Его также можно обнаружить на фолликулярных дендритных клетках и клетках-предшественниках миеломоноцитарной линии, однако он не экспрессируется на Т-клетках, моноцитах и гранулоцитах.^{1,32,33} По данным исследований in vitro, CD19 участвует в регуляции активации и пролиферации В-клеток в качестве одной из частей комплекса передачи сигнала с клеточной поверхности, включающего TAPA-1, CD21, CD81, Leu 13, а также не идентифицированные белки.^{1,33,34}

CD56

Антитела для антигена CD56 специфичны к изоформе молекулы адгезии нервных клеток (NCAM).¹⁸ NCAM, продукт альтернативного сплайсинга и гетерогенного гликозилирования, имеет молекулярный вес от 135 до 220 kd.^{1,10,32} Среди кровяных клеток изоформа с молекулярным весом 140 kd экспрессируется только на субпопуляции лимфоцитов, обладающих активностью натуральных киллеров (NK).^{1,32,35} В результате экспрессии CD56 практически все эти клетки способны запускать в периферической крови цитотоксические реакции (не связанные с TCR).^{35,36} Эта субпопуляция состоит из натуральных киллеров (CD3-/CD56+) и небольшой части Т-клеток (CD3+/CD56+).^{10,32,37} CD56 не экспрессируется на других популяциях Т- или В-лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и эритроцитов.^{30,37,38}

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Лимфоциты CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+

Определение процентного содержания и абсолютного значения лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+ можно использовать в качестве дополнительного метода оценки состояния иммунной системы при известных или неизвестных заболеваниях, а также для мониторинга уровней лимфоцитов после трансплантации органов.^{24,39,40,41,42,43,44,45,46,47}

Например, определение патологических уровней лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+ может помочь при диагностике и/или прогнозировании течения не установленных патологических состояний у пациентов с пониженным количеством лейкоцитов. Процентное содержание лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+ изменяется после трансплантации органов (почки, сердца, печени, легкого). Поэтому определение уровня Т-лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+) и/или В-лимфоцитов (CD19+) может быть полезным в качестве дополнительного способа мониторинга этих клеточных популяций.

Определение патологических уровней специфичных для иммунодефицита лимфоцитов CD4+ и отношение CD4+/CD8+ можно использовать в качестве дополнительного средства при диагностике и прогнозировании иммунодефицита. Например, инфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который является причиной синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), приводит к выраженной иммуносупрессии в основном за счет того, что снижается содержание лимфоцитов CD4+, на которых имеются рецепторы к вирусу.^{24,48} Прогрессирование клинического и иммунологического ухудшения в основном коррелирует со снижением содержания лимфоцитов CD4+.²⁴

Лимфоциты CD3-/CD56+

Функцией лимфоцитов NK является их способность к цитотоксическому воздействию (не связанному с ГКГС) на клетки-мишени, к которым относятся определенные опухолевые и инфицированные вирусами клетки.⁴⁹

Отношение CD4/CD8

Вызванные заболеванием изменения уровня лимфоцитов CD4+ и/или CD8+ могут изменять соотношение индуцирующих и супрессорных/цитотоксических клеток CD4/CD8. Поэтому определение отношения CD4/CD8 может быть полезным при диагностике и/или прогнозировании состояния иммунной системы.

Определение отношения CD4/CD8 в сочетании с подсчетом лимфоцитов CD4+ является наиболее часто используемым лабораторным показателем при СПИД.^{24,50} У пациентов с поздними стадиями СПИД отношение CD4/CD8 приближается к нулю, а лимфоциты CD4+ не определяются.²⁴ При этом уровень лимфоцитов CD8+ может быть нормальным, повышенным или пониженным.

Снижение процентного содержания лимфоцитов CD4+ и CD8+ без существенного изменения отношения CD4/CD8 может наблюдаться при стабильной функции аллотрансплантата почки после трансплантации.⁶ Кроме того, снижение отношения CD4/CD8 и процентного содержания лимфоцитов CD4+ зафиксировано у пациентов во время фенолитического восстановления после аутологической трансплантации очищенных клеток костного мозга.^{45,46}

Панель иммунофенотипирования лимфоцитов

CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 позволяет отдельно выполнять подсчет крупных подтипов лимфоцитов: Т, В и NK. Этот реагент можно использовать для контроля качества образца при определении общего процентного содержания лимфоцитов по формуле

$$\text{Общее процентное содержание лимфоцитов (\%)} = \%CD3+(T) + \%CD19+(B) + \%CD3-/CD56+(NK).^{51}$$

При использовании в качестве панели CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 совместно с CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 выполняет функцию контроля качества образца при определении общего процентного содержания лимфоцитов и определения количества лимфоцитов CD3+ на панели.⁵¹

принципы теста

Этот тест основан на способности моноклональных антител связываться с отдельными антигенными детерминантами на поверхности клетки. Специфичное окрашивание клеток осуществляется во время инкубации цельной крови с реагентом моноклональных антител. Каждый из реагентов моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 представляет собой комбинацию четырех мышиных моноклональных антител, каждое из которых конъюгировано со специфичным флуорохромом и специфично для отдельного поверхностного клеточного антигена.

Лизис эритроцитов выполняется с помощью системы реагентов COULTER IMMUNOPREP и рабочей станции Q-PREP, MULTI-Q-PREP или TQ-Prer. Оставшиеся в пробе лейкоциты анализируются методом проточной цитометрии с использованием гейтов лимфоцитов. На первой гистограмме каждого реагента селектор лимфоцитов определяется как имеющий яркую

флуоресценцию CD45+ FITC и слабое боковое рассеяние (SS).

Для CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 используются дополнительные гистограммы, позволяющие определять процент положительно окрашенных клеток: CD3+ (только положительная флуоресценция PC5), CD3+/CD4+ (положительная флуоресценция PC5/RD1), CD3+/CD8+ (положительная флуоресценция PC5/ECD), CD4+/CD8- (только положительная флуоресценция RD1) и CD4-/CD8+ (только положительная флуоресценция ECD).

Для CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 используются дополнительные гистограммы, позволяющие определять процент положительно окрашенных клеток: CD3+ (только положительная флуоресценция PC5), CD3-/CD56+ (только положительная флуоресценция RD1), CD3+/CD56+ (положительная флуоресценция PC5/RD1), CD3-/CD19+ (только положительная флуоресценция ECD).

Программное обеспечение tetraONE SYSTEM или tetraCXP SYSTEM в сочетании с реагентами моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 позволяет выполнять автоматизированный анализ субпопуляций лимфоцитов. (Подробнее см. руководство по программному обеспечению tetraONE SYSTEM или tetraCXP SYSTEM.)

РЕАГЕНТЫ

Смотрите таблицу странице 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Концентрация антител — 2,0/0,25/0,5/0,5 µg/тест для CS CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и 2,0/0,35/0,35/0,5 µg/тест для CS CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5.

Кроме антител, в состав реагентов входят 0,2% BSA, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN₃ и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

1. Данные реагенты содержат 0.1% азид натрия. Азид натрия в кислой среде образует азотистоводородную кислоту, которая является крайне токсичным соединением. При утилизации азидные соединения необходимо смывать проточной водой. Данные меры предосторожности рекомендуются выполнять во избежание отложения в металлических трубах азидных соединений, являющихся взрывоопасными. При попадании на кожу или в глаза обильно промойте водой.
2. С образцами, пробам и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
3. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
4. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. При хранении или инкубации сводите к минимуму воздействие света на реагенты.
6. Избегайте микробной контаминации реагента, в противном случае возможно получение ошибочных результатов.
7. При работе с реагентом следуйте принципам надлежащей лабораторной практики (GLP).

8. Перед составлением отчета о результатах просматривайте все гистограммы.
9. При получении результатов без автоматизированного анализа и с использованием систем проточной цитометрии FC 500 с программным обеспечением CXP убедитесь, что значение параметра "Events" (События) установлено на 100% на всех отображаемых точечных графиках.
10. При попадании в организм существует опасность отравления.
11. При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невыскранный реагент стабилен до истечения срока годности при хранении при температуре 2-8°C. Открытые флаконы стабильны 90 дней при хранении при температуре 2-8°C. Доведите реагент до температуры 2-8°C сразу после использования. Не замораживайте. Сведите к минимуму воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств данных реагентов (обычно это прозрачная розовая жидкость) могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагент использовать нельзя.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Эти реагенты, содержащие моноклональные антитела CYTO-STAT, можно использовать непосредственно из флакона. Перед использованием доведите реагенты до температуры 20-25°C.

СБОР ОБРАЗЦОВ

- Для каждого анализа методом проточной цитометрии требуется 100 µL цельной крови.
- Избегайте попадания крови на верхнюю и боковые части тестовых пробирок; в противном случае лизис может быть неполным.
- Оптимальное окрашивание достигается при количестве лейкоцитов в диапазоне 3-10 x 10³ клеток/µL.
- Если количество лейкоцитов превышает 10 x 10³ клеток/µL, может потребоваться разбавление.
- Если количество лейкоцитов меньше 3 x 10³ клеток/µL, может потребоваться центрифугирование и повторное приготовление суспензии с использованием аутологической плазмы.
- Подробнее об особенностях сбора крови методом венопункции см. процедуры сбора образцов крови для диагностики методом венопункции.⁵²

1. Получите образец венозной крови методом венопункции, соблюдая правила асептики, в пробирку для сбора крови, используя рекомендованный антикоагулянт EDTA.
2. Выполните общий подсчет лейкоцитов, используя установленную процедуру.
3. Для образцов, количество лейкоцитов в которых находится вне диапазона 3-10 x 10³ клеток/µL, может потребоваться разбавление или концентрация.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании метода Flow-Count (прямого) при обработке образцов, приготовленных с помощью лейкоцитарной пленки, возможно получение ошибочных результатов подсчета абсолютных значений. Для таких образцов используйте стандартный (непрямой) метод.

ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ РЕАГЕНТОМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ CYTO-STAT

ПОСТАВЛЯЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

CYTO-STAT tetraCHROME
CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5
[REF] 6607013 - 50 тестов (0,5 mL)

CYTO-STAT tetraCHROME
CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5
[REF] 6607073 - 50 тестов (0,5 mL)

МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ

Реагент для лизиса эритроцитов (если необходим):

Система реагентов COULTER IMMUNOPREP для рабочей станции COULTER Q-PREP, Ч.№ 7546946 - 100 тестов

ИЛИ

Система реагентов COULTER IMMUNOPREP для рабочей станции COULTER MULTI-Q-PREP или TQ-Prep, Ч.№ 7546999 - 300 тестов

Разбавитель (при необходимости) Аутологичная плазма

Комплект реагентов CYTO-COMP, Ч.№ 6607021 (4 x 0,5 mL)

ИЛИ

Комплект QuickCOMP 4 (Ч.№ 177017)

Комплект клеток CYTO-COMP, Ч.№ 6607023 (5 x 1 mL)

Контрольные клетки COULTER CYTO-TROL, Ч.№ 6604248 - 50 тестов

ИЛИ

Контрольные клетки IMMUNO-TROL, Ч.№ 6607077

ИЛИ

Клетки IMMUNO-TROL Low, Ч.№ 6607098

Калибровочные частицы Flow-Count, Ч.№ 7547053 (20 mL) (дополнительно поставляемый реагент)

Тестовые пробирки 12 x 75 mm

Пробирки для сбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется EDTA)

Переносящие пипетки

Пипетка Пастера

Микропипетки

Вихревой смеситель

Проточный цитометр (Обратитесь к главе Требуемое оборудование)

Счётчик клеток или гемацитометр

Комплект фильтров для одномодового лазера, только для проточного цитометра Cytomics FC 500, Ч.№ 179044

ИЛИ

Узел модуля фильтров для одномодового лазера, только для проточного цитометра Cytomics FC 500, Ч.№ 179045

Апplikаторы с ватными наконечниками

ТРЕБУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Проточный цитометр, который обеспечивает намагничивание и замеряет испускание светорассеивания и флуоресценцию, как указано в таблице на странице 1 и применимо для Вашего специфического продукта. Пользователи должны обратиться к руководствам изготовителя прибора за специфическими инструкциями для установки напряжения фотоэлектронного умножителя и флуоресцентной компенсации до проведения анализа.

ПРОЦЕДУРА

1. Для каждой пробы пометьте две тестовых пробирки 12 x 75 мм, по одной на каждый реагент моноклональных антител, находящийся в панели с двумя пробирками.
2. Добавьте 10 µL CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 или CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 в тестовую пробирку с соответствующей пометкой.
3. Добавьте 100 µL венозной крови в каждую тестовую пробирку. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы кровь не попала на верхнюю и боковые части тестовых пробирок, в противном случае лизис может быть неполным.
4. Осторожно встряхните. Инкубируйте реактивные смеси при 20-25°C в течение 10-12.

ВАЖНО: Капли крови, оставшиеся вокруг верхней части пробирки, необходимо удалить, так как в противном случае нелизировавшиеся эритроциты могут контаминировать конечную пробу и исказить результаты. Для удаления капель крови используйте аппликаторы с ватными наконечниками.

5. Лизируйте эритроциты в каждой тестовой пробирке, используя процедуру, рекомендованную для выбранного способа лизиса (Система реагентов COULTER IMMUNOPREP).

ПРИМЕЧАНИЕ: Если используются калибровочные частицы Flow-Count, встряхните флакон с калибровочными частицами Flow-Count и добавьте 100 µL в каждую тестовую пробирку.

6. Проанализируйте клетки на проточном цитометре с возможностью многоцветного флуоресцентного анализа, правильно стандартизованным и с выполненным гейтированием лимфоцитов. Ниже описана рекомендуемая ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА ПРОБЫ.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если используются калибровочные частицы Flow-Count, то приготовленные пробы должны быть проанализированы не позднее чем через 2 часа после добавления калибровочных частиц Flow-Count в каждую пробирку.

- a. Значения флуоресценции проточной цитометрии необходимо регистрировать на логарифмической шкале.
- b. Боковое рассеяние (SS) необходимо регистрировать на линейной шкале.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для значения рассеяния света и флуоресценции в соответствии с рекомендациями изготовителя (см. руководства по эксплуатации прибора).
2. Флуорохромы - флуоресцин изотиоцианат (FITC), фикоэритрин (RD1), фикоэритрин -Texas Red-X (ECD) и фикоэритрин-Су5 (PC5) - испускают свет с разной длиной волны, однако их спектры частично перекрываются, поэтому необходима коррекция с помощью электронной компенсации.
 - a. Оптимальные уровни компенсации могут быть получены при анализе двухпараметрической гистограммы донорских клеток, окрашенных взаимоисключающими моноклональными антителами, конъюгированными с соответствующими флуорохромами. Клетки CYTO-COMP можно окрашивать соответствующими комбинациями флуорохромов из комплекта реагентов CYTO-COMP. При любом анализе выполняется регулировка для обеспечения отсутствия окрашивания в двухцветном квадранте

(квадрант 2) с любым отдельным флуорохромом.

- b. Компенсацию по всей матрице можно установить другим способом, выполнив анализ клеток CYTO-COMP, окрашенных отдельно комплектом QuickCOMP 4 с помощью приложения AutoSetup в программном обеспечении EXPO32 ADC или CXP.
3. Перед выполнением анализа необходимо выполнить окрашивание контрольных клеток (например, контрольных клеток COULTER CYTO-TROL, клеток IMMUNO-TROL или клеток IMMUNO-TROL Low) для проверки компенсации и реактивности антител.
 4. Влияние специфических и/или неспецифических антител, связывающихся с моноцитами и гранулоцитами в пробе через Fc-фрагмент, можно исключить, выполнив правильную настройку селекции лимфоцитов на проточном цитометре.⁵³ Лимфоциты идентифицируются по яркой флуоресценции CD45+ и низкому боковому рассеянию.⁵⁴ Дополнительное использование селекторов, специфичных к клеточным линиям, может повысить воспроизводимость старых проб.⁵⁵
 5. Негативно окрашенные популяции можно использовать для установки курсора.⁵¹

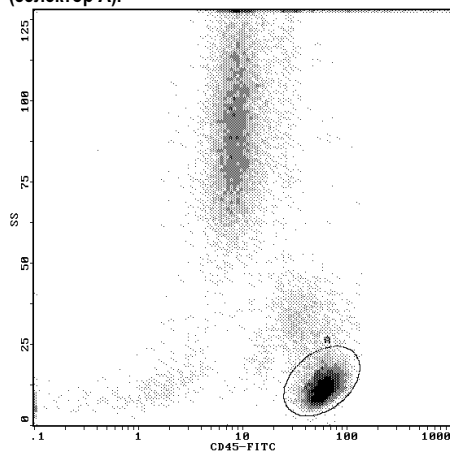
ПРИМЕР ручной настройки селекции

ОСТОРОЖНО: Если лазер проточного цитометра не выровнен, или установлены несоответствующие фильтры, или же гейты настроены неверно, возможно получение ошибочных результатов.

ВАЖНО: О дополнительных принципах настройки селекции см. ссылки.^{51,55}

1. Постройте двухпараметрическую гистограмму зависимости CD45-FITC (FL1 LOG) от SS (90° LS). Наблюдается разделение на три части. Обведите селектор (A) вокруг лимфоцитов с яркой флуоресценцией CD45+ FITC и низким SS (см. Рисунок 1).

Рисунок 1. Двухпараметрическая гистограмма зависимости CD45-FITC (FL1 LOG) от бокового рассеяния для определения лимфоцитов (селектор A).



2. Для CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5:
 - a. Создайте двухпараметрическую гистограмму с селектором лимфоцитов CD3+CD4+, CD3+CD8+ и однопараметрическую гистограмму с гейтом лимфоцитов CD3+.

3. Для CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5:
 - a. Создайте двухпараметрическую гистограмму с селектором лимфоцитов CD3-CD56+, CD19+ и однопараметрическую гистограмму с гейтом лимфоцитов CD3+.

АБСОЛЮТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Абсолютные значения можно получить двумя способами. В стандартном (непрямом) способе для расчета абсолютных значений сочетаются результаты гематологического исследования и проточной цитометрии, при этом используется следующая формула:

$$\begin{aligned} \text{Абсолютное значение (клеток/µL)} = \\ \text{Общее количество лейкоцитов (клеток/µL)} \times \\ \% \text{ лимфоцитов} \times \% \text{ положительно окрашенных} \\ \text{клеток} \times 10^4 \end{aligned}$$

В способе Flow-Count (прямым) для прямого определения абсолютных значений используются калибровочные частицы Flow-Count и следующая формула:

$$\begin{aligned} \text{Абсолютное значение (клеток/µL)} = \\ (\text{Общее число подсчитанных интересных клеток} \\ + \text{Общее число подсчитанных калибровочных} \\ \text{частиц Flow-Count}) \times \text{используемая в анализе} \\ \text{концентрация калибровочных частиц} \\ \text{Flow-Count} \end{aligned}$$

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Образцы должны быть подготовлены с реагентами CYTO-STAT tetraCHROME и системой реагентов IMMUNOPREP в течение 24 часов от момента забора.
2. Если проточный цитометрический анализ будет выполнен в течение 2 часов, то подготовленные образцы можно хранить при комнатной температуре в защищенном от света месте. В противном случае закройте пробу и храните ее в темном месте при 2-8°C. Пробу нужно проанализировать в течение 24 часов от момента забора образца.
3. Для подсчета абсолютных значений с помощью метода Flow-Count [технология единой платформы], образцы должны быть проанализированы в течение 2 часов после добавления калибровочных частиц Flow-Count.
4. Для подсчета абсолютных значений с помощью метода двойной платформы гематологический анализ должен быть выполнен в соответствии с указаниями на этикетке продукта, гематологического анализатора. Убедитесь, что указанный срок годности образца и условия хранения соблюдены.
5. Для проточного цитометрического анализа с помощью tetraONE или tetraCXP обратитесь к соответствующим системным руководствам образца и условиям стабильности подготовленного образца.
6. Использование реагентов tetraCHROME на проточном цитометре серии FC 500 требует установки комплекта фильтров для одномодового лазера (Ч.№ 179044) или узла модуля фильтров для одномодового лазера (Ч.№ 179045).
7. Перед окрашиванием или анализом выдержите образцы в пробирках для сбора крови при комнатной температуре.
8. Не охлаждайте образцы. Охлаждение образцов может привести к отклонению значений.
9. Чтобы свести к минимуму возможность получения результатов ниже оптимальных, анализируйте окрашенные клетки без задержек.
10. Рекомендуемая жизнеспособность клеток для образцов венозной крови составляет >90%, однако

это может быть трудно выполнимо для некоторых патологических образцов.

- Реагенты моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME разработаны для использования с препаратами цельной крови. Их также можно использовать с клетками IMMUNO-TROL, IMMUNO-TROL Low или с лиофилизированным препаратом контрольных клеток CYTO-TROL. Эти реагенты не рекомендуется использовать с препаратами свежих или замороженных мононуклеарных клеток.
- Не разбавляйте, не аликвотируйте по частям и не замораживайте эти реагенты. Используйте только в том виде, в котором они упакованы.
- Эти реагенты предназначены только для проточной цитометрии.
- У некоторых пациентов, получающих терапию ОКТЗ, использование этих реагентов моноклональных антител может привести к получению недостоверных результатов.^{56,57,58}
- Длительное взаимодействие клеток с лизирующими реагентами может привести к разрушению лейкоцитов и потере клеток интересующей популяции.
- Не все эритроциты могут лизироваться, в частности: ядросодержащие эритроциты, патологическая концентрация белка, гемоглобинопатия. Это может привести к ложному снижению результатов, поскольку нелизированные эритроциты будут подсчитаны как лейкоциты.
- Патологические состояния организма не всегда сопровождаются патологическими изменениями процентного содержания популяций лейкоцитов. При патологических состояниях может отмечаться такое же процентное соотношение лейкоцитов, как у здорового человека. Используйте результаты теста в сочетании с клиническими и другими диагностическими данными.
- У определенных пациентов изменение или выраженное снижение числа клеток определенных клеточных популяций может вызывать специфические нарушения.
- При проточной цитометрии возможно получение ошибочных результатов, если лазер не выровнен или неправильно настроены гейты.
- Ввиду значительных различий между разными лабораторными методами определения абсолютных значений лимфоцитов необходима оценка точности используемого метода.⁵⁹

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Образцы цельной крови были получены у визуально здоровых мужчин и женщин. Популяция была географически неоднородна и включала людей из восточных штатов США и восточной части Канады, независимо от расы и возраста (n = 24). Значения находились в ожидаемых диапазонах, описанных ранее в руководстве к системе tetraONE SYSTEM (n = 171).

Пробы окрашивались реагентами моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5. Значения определялись методом проточной цитометрии (проточный цитометр COULTER EPICS XL-MCL или Cytomics FC 500, настройка селекции лимфоцитов) и включали клетки CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD3-/CD19+ и CD3-/CD56+ (см. таблицу ниже). Для каждой пробы было получено количество лейкоцитов и пять популяций дифференцировки. Абсолютные значения определялись способом Flow-Count (прямым). Значения выражены в процентном содержании (%) от общего количества лимфоцитов и в абсолютных значениях (клеток/ μ L).

Эти значения приведены только для справки. В каждой лаборатории необходимо определить собственные ожидаемые значения, используя местную популяцию здоровых доноров.

НОРМАЛЬНАЯ ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ: CD45/CD4/CD8/CD3

| % + лимфоцитов | | | | |
|----------------------------|-------|------|-------|-------------------|
| | Число | Мин. | Макс. | Среднее \pm 1SD |
| CD3+ | 171 | 56 | 93 | 74,1 \pm 7,6 |
| CD3+CD4+ | 171 | 29 | 76 | 48,9 \pm 8,5 |
| CD3+CD8+ | 171 | 5 | 49 | 22,5 \pm 7,5 |
| Абсолютное значение | | | | |
| CD3+ | 171 | 537 | 2939 | 1333 \pm 477 |
| CD3+CD4+ | 171 | 321 | 2124 | 878 \pm 334 |
| CD3+/CD8+ | 171 | 46 | 1346 | 408 \pm 208 |

НОРМАЛЬНАЯ ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ: CD45/CD56/CD19/CD3

| % + лимфоцитов | | | | |
|----------------------------|-------|------|-------|-------------------|
| | Число | Мин. | Макс. | Среднее \pm 1SD |
| CD3+ | 171 | 55 | 94 | 74,0 \pm 7,5 |
| CD3-CD56+ | 171 | 2 | 26 | 9,3 \pm 4,7 |
| CD19+ | 171 | 1 | 37 | 13,6 \pm 5,3 |
| Абсолютное значение | | | | |
| CD3+ | 171 | 572 | 3008 | 1365 \pm 484 |
| CD3-CD56+ | 171 | 13 | 441 | 164 \pm 90 |
| CD19+ | 171 | 14 | 816 | 253 \pm 143 |

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD45 экспрессируется на всех типах кровяных клеток, кроме зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников. Он не определяется в дифференцированной некроветворной ткани.^{14,15,16,17}

Антиген CD3 в норме присутствует на клеточной поверхности зрелых тимоцитов, а также неактивированных и активированных зрелых Т-лимфоцитов периферической крови, как индуцирующей, так и супрессорной/цитотоксической популяции.^{19,20,21}

Антиген CD4 присутствует на тимоцитах и индуцирующей популяции Т-лимфоцитов в периферической крови.^{20,21} В небольших количествах он также экспрессируется на моноцитах.²⁴

Антиген CD8 обычно присутствует приблизительно на 80% тимоцитов и приблизительно на 30-35% Т-лимфоцитов периферической крови, а также на некотором количестве натуральных киллеров.^{22,30}

Антиген CD19 экспрессируется на всех В-клетках, включая ранние предшественники В-клеток.³ Его также можно обнаружить на фолликулярных дендритных клетках и клетках-предшественниках миеломоноцитарной линии, однако он не экспрессируется на Т-клетках, моноцитах и гранулоцитах.^{1,32,33}

Антиген CD56 экспрессируется только на субпопуляции лимфоцитов, обладающих активностью натуральных киллеров (НК).^{1,32,35} В результате экспрессии CD56 практически все эти клетки способны запускать в периферической крови цитотоксические реакции (не связанные с TCR).^{35,36} Эта субпопуляция состоит из натуральных киллеров (CD3-/CD56+) и небольшой части Т-клеток (CD3+/CD56+).^{1,32,37} CD56 не экспрессируется на других популяциях Т- или В-лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и эритроцитов.^{37,38,39}

Об антигенной специфичности моноклональных антител CD45, CD3, CD4 и CD8, входящих в состав реагента моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, сообщалось на Первом (CD4, CD8 и CD3) и Пятом (CD45) Международных рабочих совещаниях по типированию лейкоцитов.^{1,2}

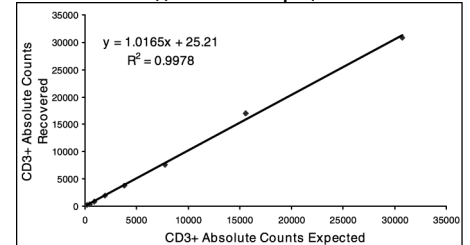
Об антигенной специфичности моноклональных антител CD45, CD3, CD19 и CD56, входящих в состав реагента моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5, сообщалось на Первом (CD3), Четвертом (CD19 и CD56) и Пятом (CD45) Международных рабочих совещаниях по типированию лейкоцитов.^{12,18}

Для оценки клеточной перекрестной реактивности моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD19 и CD56, входящих в состав реагентов моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5, были проанализированы пробы человеческой крови, взятые у здоровых взрослых доноров. Результаты убедительно продемонстрировали, что моноклональные антитела CD3, CD4, CD8, CD19 и CD56 специфично реагируют с соответствующими популяциями лимфоцитов. Моноциты слабо окрашиваются моноклональными антителами CD4.

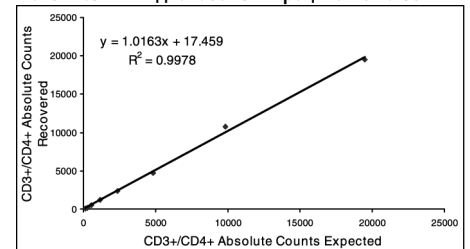
ЛИНЕЙНОСТЬ

Для оценки диапазона концентраций лимфоцитов CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3-/CD56+ выполнено три повторных измерения каждого из 8 последовательных разведений концентрированной пробы контрольных клеток COULTER CYTO-TROL. Клетки были окрашены реагентом моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 или CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 и проанализированы на проточном цитометре (COULTER EPICS XL-MCL и Cytomics FC 500, настроена селекция лимфоцитов). См. графики ниже. Результаты выражены в абсолютных значениях (клеток/ μ L).

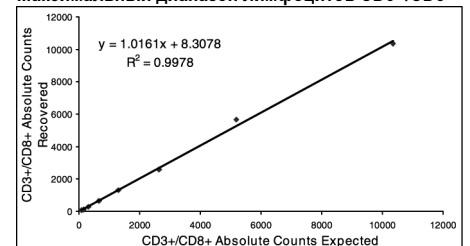
Максимальный диапазон лимфоцитов CD3+



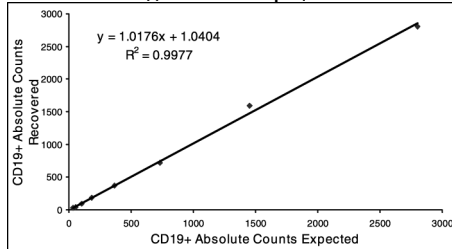
Максимальный диапазон лимфоцитов CD3+/CD4+



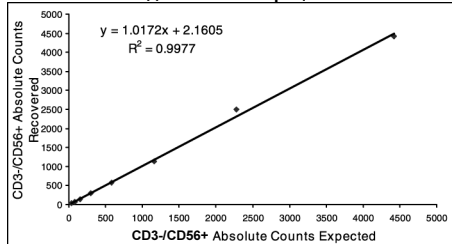
Максимальный диапазон лимфоцитов CD3+/CD8+



Максимальный диапазон лимфоцитов CD19+



Максимальный диапазон лимфоцитов CD3-/CD56+

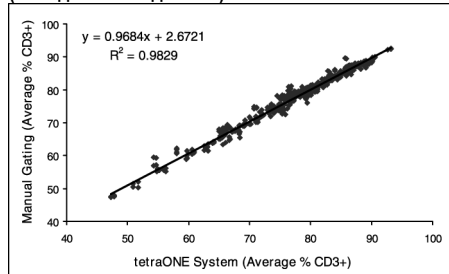


ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

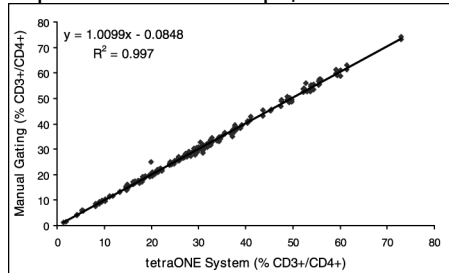
Для оценки процента совпадения результатов при использовании реагентов моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 или CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 в сравнении с реагентами tetraONE SYSTEM лизированные пробы нормальной и патологической цельной крови были проанализированы на проточном цитометре (COULTER EPICS XL-MCL и Cytomics FC 500, гейтированы лимфоциты). Полученные данные (см. таблицу и графики ниже) подтвердили предположение об эквивалентной реактивности этих реагентов в отношении T-, B- и NK-лимфоцитов периферической крови. Результаты выражены в процентных значениях (%) от общего количества лимфоцитов.

| Метод | % лимфоцитов CD3+ | | | |
|---------------------------|-------------------------|------|-------|--------------|
| | Число | Мин. | Макс. | Среднее ±1SD |
| tetraONE 45/4/8/3 | 123 | 47 | 93 | 76,4 ±9,4 |
| Ручная настройка селекции | 246 | 47 | 92 | 76,7 ±9,2 |
| Метод | % лимфоцитов CD3+/CD4+ | | | |
| | Число | Мин. | Макс. | Среднее ±1SD |
| tetraONE 45/4/8/3 | 123 | 1 | 73 | 30,2 ±14,8 |
| Ручная настройка селекции | 246 | 1 | 74 | 30,4 ±15,0 |
| Метод | % лимфоцитов CD3+/CD8+ | | | |
| | Число | Мин. | Макс. | Среднее ±1SD |
| tetraONE 45/4/8/3 | 123 | 12 | 80 | 43,1 ±17,1 |
| Ручная настройка селекции | 246 | 12 | 80 | 43,1 ±17,2 |
| Метод | % лимфоцитов CD3+ | | | |
| | Число | Мин. | Макс. | Среднее ±1SD |
| tetraONE 45/56/19/3 | 123 | 48 | 93 | 76,4 ±9,4 |
| Ручная настройка селекции | 246 | 48 | 93 | 76,6 ±9,2 |
| Метод | % лимфоцитов CD19+ | | | |
| | Число | Мин. | Макс. | Среднее ±1SD |
| tetraONE 45/56/19/3 | 123 | 1 | 33 | 12,5 ±6,5 |
| Ручная настройка селекции | 246 | 1 | 33 | 12,1 ±6,5 |
| Метод | % лимфоцитов CD3-/CD56+ | | | |
| | Число | Мин. | Макс. | Среднее ±1SD |
| tetraONE 45/56/19/3 | 123 | 1 | 29 | 7,5 ±5,3 |
| Ручная настройка селекции | 246 | 1 | 30 | 7,4 ±5,5 |

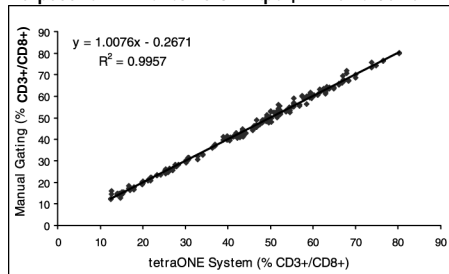
Регрессионный анализ: Лимфоциты CD3+ (объединенные данные)



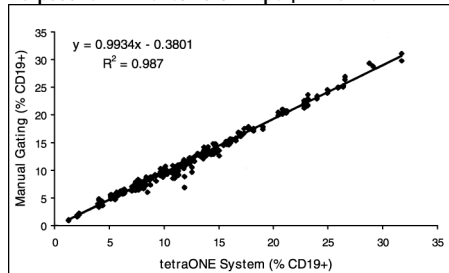
Регрессионный анализ: Лимфоциты CD3+/CD4+



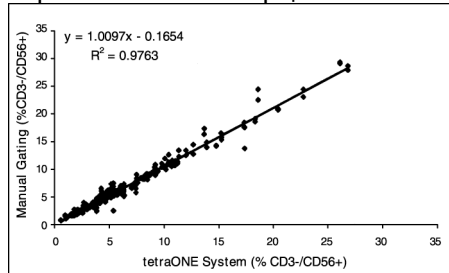
Регрессионный анализ: Лимфоциты CD3+/CD8+



Регрессионный анализ: Лимфоциты CD19+



Регрессионный анализ: Лимфоциты CD3-/CD56+



ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ИЗМЕРЕНИЙ Вариабельность внутри анализа

Процентные значения положительной популяции и абсолютные значения оценивались с использованием клеток IMMUNO-TROL и IMMUNO-TROL Low и реагентов моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5, каждый анализ в двух экземплярах, два раза в день в течение 20 дней, в двух различающихся географически регионах.

Результаты (% положительно окрашенных клеток и абсолютные значения) для популяций CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD19+ и CD3-/CD56+ соответствовали значениям анализа, указанным на вкладышах в упаковках контрольных материалов.

| Лимфоциты CD3+ Параметр: | Среднее ±1SD | | |
|-----------------------------------|--------------|-------------|-----------------|
| | Число | IMMUNO-TROL | IMMUNO-TROL Low |
| %+ | 348 | 72,5 ±1,5 | 56,7 ±1,1 |
| Абсолютное значение | 348 | 948 ±61 | 506 ±21 |
| Лимфоциты CD3+/CD4+ Параметр: | Среднее ±1SD | | |
| | Число | IMMUNO-TROL | IMMUNO-TROL Low |
| %+ | 174 | 46,6 ±1,0 | 15,9 ±0,7 |
| Абсолютное значение | 174 | 612 ±38 | 143 ±8 |
| Лимфоциты CD3+/CD8+ Параметр: | Среднее ±1SD | | |
| | Число | IMMUNO-TROL | IMMUNO-TROL Low |
| %+ | 174 | 23,1 ±0,8 | 35,4 ±1,1 |
| Абсолютное значение | 174 | 305 ±21 | 316 ±13 |
| Лимфоциты CD19+ Параметр: | Среднее ±1SD | | |
| | Число | IMMUNO-TROL | IMMUNO-TROL Low |
| %+ | 174 | 15,8 ±0,6 | 23,0 ±1,0 |
| Абсолютное значение | 174 | 205 ±9 | 204 ±12 |
| Лимфоциты CD3-/CD56+ Параметр: | Среднее ±1SD | | |
| | Число | IMMUNO-TROL | IMMUNO-TROL Low |
| %+ | 174 | 8,2 ±0,4 | 13,2 ±0,6 |
| Абсолютное значение | 174 | 105 ±6 | 116 ±8 |

ССЫЛКИ

- Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF and Todd RF, eds. Leukocyte Typing V. Oxford, UK: Oxford University Press, 1995, Vol. 1. pp. 262, 263, 268, 270, 507-511; Vol. 2. pp. 1398-1400.
- Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. Leukocyte Typing. Springer-Verlag, New York; 1984, pp. 28, 41-42, 44, 196.
- McMichael AJ, ed. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, 1987, pp. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 170-172, 176, 199, 202, 206, 302-308, 315, 475, 796-801.
- Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le J-M, Tantravahi R, and Ritz J. Characterization of a cell line, NK1, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. Experimental Hematology, 1996, 24:406-415.
- Aiuta F, Cerottini J-C, Coombs RRA, Cooper M, Dickler HB, Froland S, Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig J, Preud'homme J-L, Rabbellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegal FP, Stjernsward J, Terry WD and Wlybran J. Identification, enumeration and isolation of Band T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies (IUIS), Report - July 1974. Clin Immunol and Immunopathol, 1975, 3:584-597.
- Foon KA and Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood, 1986, 68:1-31.
- Hercend T, Meuer SC, Reinherz EL, Schlossman SF and Ritz J. Generation of a cloned NK cell line derived from the "null cell" fraction of human peripheral blood. J Immunol, 1982, 129:1299-1305.
- Mishell B, Shigi S eds. Selected Methods in Cellular Immunology. New York: WH Freeman and Co., 1980, pp 69-123.
- Drexler HG, Gignac SM, and Miniwada J. Routine immunophenotyping of acute leukemias. Blut, 1988, 57:327-339.
- Robertson MJ, Ritz J. Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells. Blood, 1990, 76:2421-2438.
- Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, and Bernstein ID. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag, 1986, Vol 2: pp 8, 15-25, 37.

12. Newman, W Targan SF, and Fast LD. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. *Mol Imm*, 1984, 21:1113-1121.
13. Fabre JW and Williams AF. Quantitative serological analysis of a rabbit anti-rat lymphocyte serum and preliminary biochemical characterization of the major antigen recognized. *Transplantation* 1997, 23:349-359.
14. Coffman RL and Weissman IL. B220: A B cell specific member of the T-200 glycoprotein family. *Nature*, 1981, 289:681-693.
15. Dalchau R and Fabre JW. Identification with a monoclonal antibody of predominantly B lymphocyte specific determinant of the human leucocyte common antigen. *J Exp Med*, 1980, 153:753-757.
16. Omary MB, Trowbridge IS and Battifora HA. Human homologue of murine T-200 glycoprotein. *J Exp Med*, 1980, 152:842-852.
17. Dalchau R, Kirkley J and Fabre JW. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte common (L-C) antigen of rat. *Eur J Immunol*, 1981, 10:737-744.
18. Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, and von dem Borne AEGKr., eds. *Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1989, pp. 536, 541, 699-702.
19. Reinherz EL and Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell*, 1980, 19:821-827.
20. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. *Cell*, 1982, 30:735-743.
21. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. *Nature*, 1983, 303:808-810.
22. Reinherz EL, Meuer SC, and Schlossman SF. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunology Today*, 1983, 4:5-8.
23. Reinherz EL, Morimoto C, Fitzgerald KA, Hussey RE, Daley JF, and Schlossman SF. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. *J Immunol*, 1982, 128:463-468.
24. de Martini RN and Parker JW. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. *J Clin Lab Anal*, 1989, 3:56-70.
25. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich AR and Schlossman SF. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. *J Immunol*, 1985, 134:1508-1515.
26. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Brown HM and Schlossman SF. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. *Eur J Immunol*, 1986, 16:198-204.
27. Meuer SC, Schlossman SF and Reingerz EL. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79:4395-4399.
28. Shaw S. *Leukocyte Differentiation Antigen Database*. Version 1.11 5th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, 1994. Available from Stephen Shaw, National Institutes of Health, on disk; NIH ftp site (ncbi.nlm.nih.gov/pub/shaw/LDAD/ldad1.zip), Bethesda, MD
29. Reinherz EL, Hussey RE, Fitzgerald K, Snow P, Terhost C and Schlossman SF. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. *Nature*, 1981, 294:168-170.
30. Caligiuri M, Murray C, Buchwald D, Levine H, Cheney P, Peterson D, Komaroff AL and Ritz J. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. *J Immunol*, 1987, 139:3306-3313.
31. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daly JF and Schlossman SF. B4, a human B lymphocyte associated antigen expressed on normal, mitogen activated and malignant B lymphocytes. *J Immunol*, 1983, 131:244-250.
32. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Samoza C, Williams AF eds. *The Leucocyte Antigen Facts Book*. London: Academic Press, 1993, pp. 106-109.
33. Tedder TF and Isaacs CM. Isolation of a cDNA encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes: a new member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*, 1989, 143:712-717.
34. Tedder TF, Inaoka M and Sato S. The CD10-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity*, 1997, 6:107-118.
35. Griffin JD, Hercend T, Beveridge RP, and Schlossman SF. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. *J Immunol*, 1983, 130:2947-2951.
36. Hercend T, Griffin JD, Bensussan A, Schmidt RE, Edson MA, Brennan A, Marray C, Daley JF, Schlossman SF, and Ritz J. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest*, 1985, 75:932-943.
37. Schmidt RE, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, and Ritz J. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J Exp Med*, 1986, 164:351-356.
38. Schmidt RE, Michon JM, Woronicz J, Schlossmann SF, Reinherz EL, and Ritz J. 1987. Enhancement of natural killer function through activation of the T11 E rosette receptor. *J Clin Invest* 79:305-308.
39. Benjamini E and Leskowitz S. *Immunology: A Short Course*. Second Edition. New York: Wiley-Liss, 1991, 211-244.
40. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1980, 125:1269-1274.
41. Felsenstein D, Carney WP, Lacoviello VR and Hirsch MS. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus induced mononucleosis. *J Infect Dis*, 1985, 152:198-203.
42. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. *Infect Immun*, 1983, 40:472-477.
43. Goldstein G, Lifter J and Mittler R. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*. McMichael AJ and Fabre JW, eds. New York, NY: Academic Press, 1982, pp. 39-70.
44. Schmidt RE: Monoclonal antibodies for diagnosis of Immunodeficiencies. *Blut*, 1989, 59:200-206.
45. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Hefflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. *Blood*, 1989, 74:2203-2211.
46. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, Van Leeuwen E, Capel PJA and Haanen C. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WTI-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Blood*, 1989, 74:1152-1158.
47. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. *Transplantation*, 1989, 47:465-471.
48. Fauci AS: The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. *Science*, 1988, 239:617-622.
49. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*, 1989, 47:187.
50. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV: CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. *J AIDS*, 1989, 2:114-124.
51. Centers for Disease Control and Prevention. Revised guidelines for performing CD4+ T-Cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*, 1997; 46 (No. RR. 2):1-29.
52. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Edition (H3). Clinical and Laboratory Standards Institute.
53. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry*, 1990, 11:453-459.
54. Nicholson JKA, Hubbard M and Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*, 1996, 26:16-21.
55. Bergeron M, Nicholson JKA, Phaneuf S, Ding, T, Soucy N, Badley AD, Hawley Foss NC and Mandy F. Selection of lymphocyte gating protocol has an impact on the level of reliability of T-cell subsets in aging specimens. *Cytometry (Clinical Cytometry)*, 2002, 50:53-61.
56. Gebel HM, Lebeck LL, Jensik SC, Landay AL and Bray RA. Discordant expression of CD3 and T-cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated with OKT3. *Transplantation Proceedings* 1989, 1:1745-1746.
57. Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissensen GW, Karjalainen K and De Le Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In *Leukocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*. Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H and Kr. von dem Borne AEG, eds. 1989. Oxford: Oxford University Press, pp. 295-296.
58. Schroeder TI and Chatenoud L: Immunological monitoring during treatment with OKT3. Presented under the auspices of the American Society of Transplant Surgeons.
59. Koepke JA and Landay AL. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. *Clin Immunol Immunopathol*, 1989, 52:19-27.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

CYTO-STAT tetraCHROME
CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5
[REF] 6607013 - 50 тестов (0,5 mL)

CYTO-STAT tetraCHROME
CD45-FITC/CD56-RD1/ CD19-ECD/CD3-PC5
[REF] 6607073 - 50 тестов (0,5 mL)

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-526-7694 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.



Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821
www.beckmancoulter.com



Beckman Coulter Ireland Inc.
Mervue Business Park,
Mervue, Galway,
Ireland (353 91 774068)

Made in USA

© 2012 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.