

**Cyto-Stat®**  
**triCHROME™**  
**CD45-FITC/CD19-RD1/  
CD3-PC5**

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР 6607072 – 50 тестов

PN 4238066-D



	CD45-FITC	CD19-RD1	CD3-PC5
<b>Специфичность</b>	CD45	CD19	CD3
<b>Клон</b>	B3821F4A <sup>1</sup>	J3-119 <sup>38,39</sup>	UCHT1 <sup>2,40</sup>
<b>Гибридома</b>	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c
<b>Иммуноген</b>	Трансфектант, содержащий кДНК человеческого CD45	Клетки лимфомы SKLY 18	Тимоциты и лимфоциты периферической крови, полученные от пациента, страдающего синдромом Сезари
<b>Цепь иммуноглобулина</b>	IgG2b <sup>1</sup>	IgG1 <sup>2,40</sup>	IgG1 <sup>2,40</sup>
<b>Вид животных</b>	Мышь	Мышь	Мышь
<b>Источник</b>	Асцитная жидкость	Подготовленная среда	Подготовленная среда
<b>Способ очистки</b>	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
<b>Флуоресценция</b>	Возбуждение при 468-509 нм / Эмиссия при 504-541 нм	Возбуждение при 486-580 нм / Эмиссия при 568-590 нм	Возбуждение при 486-580 нм / Эмиссия при 660-680 нм
<b>Конъюгат</b>	FITC (Флуоресцин-изотиоцианат)	RD1 (Фикоэритрин)	PC5 (Фикоэритрин-Су5)
<b>Молярное соотношение</b>	FITC/Белок: 3-10	RD1/Белок: 0.5-1.5	PC5/Белок: 0.5-1.5

**МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА**

**Для диагностики *In Vitro***

**НАЗНАЧЕНИЕ**

Реагент Cyto-Stat triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 – это трехцветный флуоресцентный реагент, содержащий мышьные моноклональные антитела, специфичные к трем маркерам. Антитела помечены различными флуорохромами. Реагент позволяет проводить одновременную идентификацию и подсчет CD3+ (Т) и CD3-/CD19+ (В) лимфоцитов в цельной крови методом проточной цитометрии.<sup>1-3</sup> Для мониторинга неспецифического окрашивания используется изотипический контроль CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5.

**КРАТКАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

Популяция лимфоцитов в периферической крови человека состоит из трех типов клеток: Т-клеток (образующихся в тимусе), В-клеток (образующихся в костном мозге), и НК-клеток (естественных или натуральных киллеров).<sup>4</sup> При микроскопическом исследовании эти клетки морфологически не различаются, однако они несут на цитоплазматических мембранах разные антигены.

Т-, В- и НК-лимфоциты играют основную роль в функционировании иммунной системы. Разные подтипы Т-лимфоцитов могут распознавать специфические антигены, выполнять эффекторные функции и/или контролировать одновременно тип и интенсивность клеточных и/или гуморальных иммунных реакций. При активации антигенами или макрофагами при участии Т-лимфоцитов, специфические В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые производят и секретируют специфические иммуноглобулины (Ig). НК-лимфоциты были идентифицированы как отдельная популяция цитолитических эффекторных клеток, которые, по-видимому, играют ключевую роль в регуляции гемопоза, защите от инфекций и разрушении клеток злокачественных опухолей. Цитолитическая активность НК-лимфоцитов не контролируется антигенами классов I и II главного комплекса гистосовместимости (МНС).<sup>4</sup>

На протяжении долгого времени для идентификации и подсчета Т- и В-лимфоцитов

использовались клеточные маркеры, такие как рецептор к эритроцитам барана на Т-лимфоцитах (Е-розеткаобразование) и иммуноглобулины наружной мембраны (SmIg) на В-лимфоцитах.<sup>5,6</sup> Хотя метод Е-розеткаобразования специфичен для Т-лимфоцитов, он не очень удобен, поскольку идентификацию и подсчет комплексов эритроцитов барана с Т-лимфоцитами можно выполнить только вручную с помощью светового микроскопа. Использование SmIg в качестве маркера для идентификации и подсчета В-лимфоцитов также имеет свои недостатки, поскольку другие популяции клеток могут экспрессировать SmIg и/или связывать Ig посредством рецепторов к кристаллизующимся фрагментам (Fc) IgG, что приводит к ложноположительной реакции. Для идентификации и подсчета НК-лимфоцитов обычно используются стандартные методы цитотоксических исследований, такие как метод с радиоактивным хромом<sup>7</sup> и метод гемолитических бляшек.<sup>8</sup>

Относительно недавно были получены моноклональные антитела для идентификации и подсчета Т-, В- и НК-лимфоцитов.<sup>6, 9, 10</sup> По сравнению с поликлональными антителами (гетероантисывороткой), малоспецифичными к данным клеточным популяциям, моноклональные антитела позволяют определять только специфические поверхностные антигены Т-, В- и НК-клеток. Использование моноклональных антител позволяет более точно подсчитать количество лимфоцитов, а в сочетании с другими клеточными маркерами (TdT, антиген, связанный с HLA-D, SmIg) определить различные стадии дифференцировки Т- и В-клеток.

Поверхностные антигены клеток, по-видимому, приобретаются и теряются Т- и В-лимфоцитами, таким образом отражая стадию зрелости (дифференцировки) и/или функциональное состояние клетки. Одна и та же клетка в разные периоды времени может экспрессировать некоторые или все приобретенные ранее антигены одновременно.

Экспрессия Т-лимфоцитами поверхностных антигенов, характерных для всех Т-клеток, происходит в следующей последовательности: CD7 (ранний протимоцит), CD2 (средний протимоцит), CD5 (незрелый тимоцит), цитоплазматический антиген CD3 (незрелый и промежуточный тимоцит) и CD3 (зрелый тимоцит).<sup>3,9</sup>

Далее, сначала происходит коэкспрессия (в промежуточных тимоцитах), а затем раздельная экспрессия (в зрелых тимоцитах) антигенов CD4 (клетка-индуктор) и CD8 (клетка-супрессор/цитотоксическая клетка).<sup>3,9</sup> Молекулы CD7, CD2, CD5 и CD3 (а также CD4 или CD8) продолжают коэкспрессироваться на всех клетках цепи дифференцировки Т-лимфоцита, включая неактивные и активированные зрелые Т-лимфоциты периферической крови и лимфоидной ткани.

Экспрессия В-лимфоцитами поверхностных антигенов, характерных для всех В-клеток, происходит в следующей последовательности: CD19 (коммитированная клетка-предшественник В-лимфоцита/пре-пре-В-клетка); CD20 (ранняя пре-В-клетка).<sup>3,9,11</sup> Антигены CD19 и CD20 продолжают коэкспрессироваться на всех клетках цепи дифференцировки В-лимфоцита, включая неактивные и активированные зрелые В-лимфоциты периферической крови и лимфоидной ткани. Оба эти антигена исчезают на последней стадии дифференцировки В-лимфоцита – в плазматической клетке.

Антигены CD21 (зрелые неактивные В-лимфоциты периферической крови и лимфоидной ткани) и CD22 (пре-В-клетки) представляют собой рестриктированные поверхностные антигены В-клеток, которые исчезают на зрелых В-лимфоцитах периферической крови и лимфоидной ткани во время их активации.<sup>3,11</sup> Экспрессии на поверхности клетки молекулы CD22 предшествует ее экспрессия в цитоплазме (пре-пре-В-клетка).

Существуют доказательства, что НК-клетки происходят от костномозговых клеток-предшественников и могут полностью дифференцироваться в костном мозге без участия тимуса.<sup>10</sup>

Реагенты на основе моноклональных антител, специфичных к поверхностным антигенам всех Т-клеток, всех В-клеток или всех НК-клеток, можно использовать для идентификации и подсчета Т-, В- и НК-лимфоцитов, соответственно. Реагент с моноклональными антителами, специфичными к определенному клеточному поверхностному антигену, также можно использовать для определения стадии созревания (дифференцировки) и/или функционального состояния популяции лимфоцитов. В представленном методе исследования моноклональные антитела к CD3,

CD19 и CD45 используются для идентификации и подсчета Т- и В-лимфоцитов периферической крови за счет специфического связывания с общим поверхностным антигеном Т- и В-клеток, CD3 и CD19, соответственно. Данный тест позволяет выполнять одновременный анализ субпопуляций лимфоцитов в одном образце цельной крови с использованием одного реагента. Кроме того, тест позволяет подсчитать клетки в основных субпопуляциях лимфоцитов при использовании трехцветной панели иммунофенотипирования лимфоцитов, которая включает реагент на основе моноклональных антител, предназначенный для идентификации и подсчета NK-лимфоцитов.

#### CD45

Антитела к CD45 распознают все общие лейкоцитарные антигены семейства CD45 с молекулярным весом 180, 190, 210 и 220 кД.<sup>3,12,13</sup> CD45 также известен как общий лейкоцитарный антиген (LCA). Антиген CD45 экспрессируется всеми типами гемопоэтических клеток, кроме зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников.<sup>14,15</sup> Данный антиген не был обнаружен в дифференцированной негемопоэтической ткани.<sup>14-17</sup>

#### CD19

Антиген CD19 экспрессируется на всех В-клетках, включая ранних предшественников В-клеток.<sup>3</sup> Антиген CD19 является мембранным гликопротеином с молекулярной массой 95 кДа.<sup>1</sup> Экспрессия CD19 сохраняется на всех стадиях созревания и прекращается только на конечной стадии дифференцировки в плазматическую клетку.<sup>1,18</sup> Также этот антиген присутствует на фолликулярных дендритных клетках и клетках-предшественниках миеломоноцитарной линии, но отсутствует на Т-клетках, моноцитах и гранулоцитах.<sup>1,19,20</sup> В исследованиях *in vitro* было показано, что антиген CD19 участвует в регуляции активации и пролиферации В-клеток в составе комплекса сигнальной трансдукции, расположенного на поверхности клетки и включающего TAPA-1, CD21, CD81, Leu 13 и другие не идентифицированные белки.<sup>1,20,21</sup>

#### CD3

Антитела к антигену CD3 специфичны к эпсилон цепи пятицепочечной молекулы CD3-компонента комплекса TCR.<sup>3,19</sup> Молекулярная масса этой цепи составляет 20 кДа.<sup>19</sup> Этот линиспецифический общий для всех Т-клеток антиген обычно присутствует на поверхности зрелых тимоцитов, а также на поверхности неактивных и активированных зрелых Т-лимфоцитов периферической крови (относящихся как к популяции индукторов, так и к популяции супрессоров/цитотоксических клеток).<sup>22-24</sup>

### КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

#### Лимфоциты CD3+ и CD19+

Определение процентной доли и подсчет абсолютного количества лимфоцитов CD3+ и/или CD19+ может использоваться в качестве вспомогательного средства для оценки состояния иммунной системы при известных и неизвестных заболеваниях,<sup>25-33</sup> а также для мониторинга уровня этих клеток после трансплантации органов.<sup>29,34-36</sup>

Например, идентификация аномального уровня лимфоцитов CD3+ и/или CD19+ может помочь при диагностике и/или прогнозировании течения заболеваний, связанных с уменьшением количества лейкоцитов. Анализ CD3+ лимфоцитов в сочетании с анализом CD4+ (индукторных) и CD8+ (супрессорных/цитотоксических) Т-лимфоцитов и определение соотношения CD4+/CD8+ может оказаться полезным при диагностике и/или прогнозе развития иммунодефицитных заболеваний, например, при инфицировании

вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), являющимся этиологическим агентом синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа).<sup>25,30-33</sup> Изменение процентной доли лимфоцитов CD3+ и/или CD19+ после трансплантации органа (почки, сердца, печени, легкого) свидетельствует о том, что подсчет количества Т- и/или В-лимфоцитов может использоваться в качестве вспомогательного средства при мониторинге данных клеточных популяций.

#### Панель для иммунофенотипирования лимфоцитов

В составе панели иммунофенотипирования лимфоцитов, которая включает реагент для определения NK-лимфоцитов (CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD3-PC5), реагент CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 позволяет определить количество клеток в основных популяциях лимфоцитов: Т, В и NK.<sup>37</sup> Общая процентная доля лимфоцитов (%) = %CD3+ (Т-лимфоцитов) + %CD19+ (В-лимфоцитов) + % CD3-/CD56+ (NK-лимфоцитов). При работе с панелью этот реагент также может использоваться для проверки качества образца посредством определения общего процентного содержания лимфоцитов и содержания CD3+ лимфоцитов.<sup>37</sup>

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный тест основан на способности моноклональных антител связываться с поверхностные клеток, экспрессирующих определенные антигенные детерминанты. Реагент CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 изготовлен на основе моноклональных антител, специфичных к трем разным поверхностным антигенам. Специфическое окрашивание клеток достигается посредством инкубации образца цельной крови с реагентом CYTO-STAT triCHROME. Окрашивание второй аликвоты изотипическим контролем CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 позволяет оценить неспецифическую фоновую флуоресценцию. При подготовке образца выполняется лизис эритроцитов. Затем оставшиеся лейкоциты анализируются на проточном цитометре с использованием гейтирования лимфоцитов. На первой диаграмме популяция (гейт) лимфоцитов характеризуется интенсивной флуоресценцией CD45+ FITC и низким уровнем светорассеяния в боковом направлении (SS). На второй диаграмме процентное содержание положительных клеток определяется четырьмя квадрантами: CD3-/CD19+ (только флуоресценция RD1), CD3+/CD19+ (флуоресценция PC5/RD1), CD3-/CD19- (клетки отрицательные по флуоресценции PC5/RD1) и CD3+/CD19- (только флуоресценция PC5).

#### РЕАГЕНТ

См. таблицу на странице 1.

#### СОСТАВ РЕАГЕНТА

Концентрация антител составляет 2.0/0.7/0.5 мкг/тест.

Кроме антител в состав реагента входят 0.2% бычий сывороточный альбумин (BSA), 0.01 М фосфат калия, 0.15 М NaCl, 0.1% NaN<sub>3</sub> и стабилизаторы.

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

1. Данный реагент содержит 0.1% азид натрия. В кислой среде азид натрия образует азотисто-водородную кислоту, являющуюся чрезвычайно токсичным соединением. При утилизации соединений азидов рекомендуется смывать их в водопроводно-канализационную систему большим количеством проточной воды. Эти меры предосторожности позволяют избежать накопления азидов натрия в металлических трубах и предотвратить образование взрывчатых веществ. При попадании

реагентов в глаза или на кожу, смойте большим количеством воды.

2. Все образцы и контактирующие с ними материалы следует рассматривать как потенциально инфицированные. При работе с ними и утилизации необходимо соблюдать все надлежащие меры предосторожности.
3. Никогда не отбирайте образец через пипетку ртом. Избегайте контакта образца с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не используйте реагент после истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. При хранении и инкубации реагента воздействие света должно быть сведено к минимуму.
6. Избегайте контаминации реагента микроорганизмами, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
7. При работе с этим реагентом следует соблюдать требования GLP (Good Laboratory Practice).
8. Перед сообщением результатов просмотрите все диаграммы.
9. Реагент опасен при проглатывании.
10. При попадании реагента на кожу немедленно смойте большим количеством воды.

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

При температуре хранения 2-8°C реагент в нераспечатанном флаконе стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке флакона. В распечатанном флаконе реагент стабилен в течение 90 дней при температуре хранения 2-8°C. Сразу же после использования верните реагент в место хранения с температурой 2-8°C. Не замораживать. Воздействие света свести к минимуму. Перед использованием довести температуру реагента до 20-25°C.

### ПРИЗНАКИ НЕПРИГОДНОСТИ РЕАГЕНТА

Изменение физического состояния реагента (в норме он представляет собой прозрачную жидкость розового цвета) или значительные вариации значений контролей могут свидетельствовать о непригодности реагента. Такой реагент использовать не рекомендуется.

### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА

Подготовка не требуется. Используйте моноклональные антитела CYTO-STAT непосредственно во флаконе.

### ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

**ВНИМАНИЕ:** Стабильность образцов крови колеблется. Для получения наиболее точных результатов следует выполнить анализ в течение 6 часов после венопункции. Неокрашенные образцы крови с антикоагулянтом до начала подготовки должны храниться при температуре 20 - 25°C. Не замораживайте образцы.

Асептически с помощью венопункции отберите образцы венозной крови в пробирки с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА).<sup>41</sup> Для каждого исследования необходимо 100 мкл цельной крови. Отберите достаточное количество крови для выполнения теста, анализа контроля и разведения образцов аутологичной плазмы, если потребуется. Для каждого образца крови необходимо подсчитать количество лейкоцитов и их жизнеспособность, используя стандартную лабораторную процедуру. Рекомендованная жизнеспособность клеток составляет ≥ 90%, однако в случае некоторых аномальных образцов это значение труднодостижимо.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Реагент CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5  
Каталожный номер 6607072 – 50 тестов (0.5 мл)

### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Набор реагентов для лизиса эритроцитов (один из перечисленных ниже):

Набор реагентов COULTER® IMMUNOPREP™ для работы со станцией пробоподготовки COULTER Q-PREP™ (каталожный номер 7546946, 100 тестов)

Дилуэнт (если требуется) – аутологичная плазма ИЛИ

Набор реагентов COULTER IMMUNOPREP для работы со станциями пробоподготовки COULTER MULTI-Q-PREP™ и TQ-Prep™ (каталожный номер 7546999, 300 тестов)

Дилуэнт (если требуется) – аутологичная плазма

Реагент CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MslgG1-RD1/MslgG1-PC5, каталожный номер 6607019

Реагент CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD3-PC5, каталожный номер 6607071 (дополнительный реагент)

Набор реагентов CYTO-COMP™, каталожный номер 6607021 (4 x 0.5 мл)

Клетки CYTO-COMP, каталожный номер 6607023 (5 x 1 мл)

Контроль COULTER CYTO-TROL™, каталожный номер 6604248 – 50 тестов

Флуоросферы Flow-Count™, каталожный номер 7547053 (20 мл) (дополнительный реагент)

Пробирки для анализа размером 12 x 75 мм

Пробирки для отбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется использовать ЭДТА)

Пипетки без градуировки

Пастеровская пипетка

Микропипетки

Миксер (вортекс)

Проточный цитофлуориметр (см. раздел «ТРЕБОВАНИЯ К АНАЛИЗАТОРУ»)

Счетчик клеток или гемоцитометр

Фильтр (только для проточного цитофлуориметра COULTER EPICS™ XL™/XL-MCL™ с тремя датчиками флуоресценции), каталожный номер 6915056

Ватные палочки

### ТРЕБОВАНИЯ К АНАЛИЗАТОРУ

Для исследования необходимо использовать проточный цитофлуориметр, обеспечивающий возбуждение и регистрацию флуоресценции и светорассеяния в соответствии с требованиями таблицы на странице 1. Перед анализом пользователь должен прочитать руководства к прибору и выполнить инструкции по настройке напряжения фотоумножителей и компенсации флуоресценции.

### ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ

1. Оптимальное окрашивание достигается, когда концентрация лейкоцитов в образце находится в диапазоне 3-10 x 10<sup>3</sup> клеток/мкл. Образцы с концентрацией лейкоцитов выше 10 x 10<sup>3</sup> клеток/мкл должны быть разведены, а образцы с концентрацией лейкоцитов ниже 3 x 10<sup>3</sup> клеток/мкл должны быть отцентрифугированы и ресуспендированы таким образом, чтобы конечная концентрация лейкоцитов попадала в диапазон 3-10 x 10<sup>3</sup> клеток/мкл. При использовании набора реагентов COULTER IMMUNOPREP в качестве дилуэнта рекомендуется применять аутологичную плазму.

### Аномальные образцы

- Высокая концентрация лейкоцитов (>10 x 10<sup>3</sup> клеток/мкл)  
10-20 x 10<sup>3</sup>: Разведите кровь в отношении 1:2.  
20-30 x 10<sup>3</sup>: Разведите кровь в отношении 1:3.  
30-40 x 10<sup>3</sup>: Разведите кровь в отношении 1:5.  
40-60 x 10<sup>3</sup>: Разведите кровь в отношении 1:6.  
60-100 x 10<sup>3</sup>: Разведите кровь в отношении 1:10.  
100-200 x 10<sup>3</sup>: Разведите кровь в отношении 1:20.
- Низкая концентрация лейкоцитов (<3 x 10<sup>3</sup> клеток/мкл)  
- Процедура получения лейкоцитной пленки
  - Центрифугируйте образец крови в течение 5 минут при 500 x g и при температуре 20-25°C.
  - Отберите лейкоцитную пленку с помощью пастеровской пипетки, захватив немного эритроцитов и плазмы. Это обеспечит отбор всех лейкоцитов.
  - Полностью ресуспендируйте клетки, перемешав их несколько раз с помощью пастеровской пипетки.
  - Определите концентрацию клеток с помощью счетчика клеток или гемоцитометра.
  - С помощью дилуэнта доведите концентрацию клеток до 10 x 10<sup>3</sup> клеток/мкл.
- Для каждого образца пометьте две пробирки размером 12 x 75 мм: одну для моноклональных антител, а вторую для изотипического контроля. Внесите в соответствующие пробирки по 10 мкл CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 и реагента CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MslgG1-RD1/ MslgG1-PC5.
- Внесите в каждую пробирку по 100 мкл образца венозной крови. Следите за тем, чтобы кровь не попала на стенки и верхнюю часть пробирки, поскольку это может привести к неполному лизису.
- Аккуратно перемешайте на вортексе. Инкубируйте реакционные смеси при температуре 20-25°C в течение 10-12 минут.

**ЭТО ВАЖНО:** Если в верхней части пробирки присутствуют капли крови, их необходимо удалить. В противном случае не подвергшиеся лизису эритроциты могут попасть в подготовленный образец и привести к получению ошибочных результатов. Для удаления капель крови можно использовать ватные палочки.

5. В каждой пробирке выполните лизис эритроцитов. Используйте процедуру, рекомендованную в соответствии с применяющейся методикой лизиса (с помощью набора реагентов COULTER IMMUNOPREP).

**ЗАМЕЧАНИЕ:** При использовании флуоросфер Flow-Count перемешайте содержимое флакона и добавьте по 100 мкл флуоросфер в каждую пробирку.

6. Проанализируйте образцы с помощью проточного цитофлуориметра, позволяющего выполнять многоцветный флуоресцентный анализ и стандартизированный надлежащим образом. Гейты для популяций лимфоцитов также должны быть установлены надлежащим образом (см. указания приведенного ниже раздела «ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА ОБРАЗЦОВ»). Чтобы свести к минимуму вероятность получения недостоверных результатов, проанализируйте образцы сразу же после окрашивания.

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Если вы используете флуоросферы Flow-Count, подготовленные образцы должны быть проанализированы в течение 2 часов после добавления флуоросфер Flow-Count.

- Для представления данных флуоресценции следует использовать логарифмическую шкалу.
- Данные светорассеяния должны быть представлены в линейном масштабе.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

### ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Убедитесь в том, что проточный цитофлуориметр настроен надлежащим образом, а светорассеяние и флуоресценция стандартизованы в соответствии с рекомендациями изготовителя (см. руководства к прибору).

Флуорохромы флуоресцинизиотиоцианат (FITC), фикозитрин (RD1) и фикозитрин-Cu5 (PC5) излучают на разных длинах волн, однако их спектр в некоторой степени перекрывается, что необходимо откорректировать с помощью электрической компенсации. Оптимальные уровни компенсации можно установить, проанализировав на двупараметровой диаграмме клетки донора, окрашенные каждым флуорохромом по отдельности. Альтернативный способ – использование набора реагентов CYTO-COMP и окрашивание клеток CYTO-COMP комбинацией флуорохромов. В любом случае необходимо настроить компенсацию таким образом, чтобы при использовании отдельных флуорохромов не наблюдалось окрашивания в квадранте с клетками, положительными по двум красителям (второй квадрант). Контрольные клетки COULTER CYTO-TROL, окрашенные реагентом CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 можно использовать для проверки настроек компенсации.

Перед анализом образцов необходимо выполнить окрашивание контроля (например, контрольных клеток COULTER CYTO-TROL), чтобы убедиться в реактивности антител.

Специфическое и/или неспецифическое взаимодействие антител с моноцитами и гранулоцитами через Fc-фрагмент можно исключить, используя правильное гейтирование лимфоцитов в программном обеспечении цитофлуориметра.<sup>42</sup> Лимфоциты первоначально идентифицируются, как клетки, имеющие яркую флуоресценцию CD45+ и низкое светорассеяние в боковом направлении.<sup>43</sup>

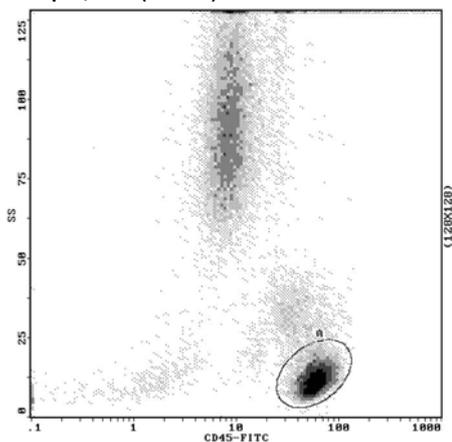
Изотипический контроль CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MslgG1-RD1/ MslgG1-PC5 используется для определения положения курсора с учетом неспецифического связывания лимфоцитов через Fc-фрагмент антител. Курсор устанавливается таким образом, чтобы 98% (номинально) неспецифической флуоресценции попало в квадрант 3. Неспецифическая флуоресценция в квадрантах 1, 2 и 4 в нормальных образцах для любого контроля, как правило, ограничивается 2% (если это значение превышает 2%, результаты теста могут быть ошибочными). Более высокие значения могут наблюдаться при некоторых неопластических заболеваниях.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА ОБРАЗЦОВ

**ВНИМАНИЕ:** Если лазер проточного цитофлуориметра не настроен, используются не те фильтры или гейты установлены неверно, могут быть получены ошибочные результаты.

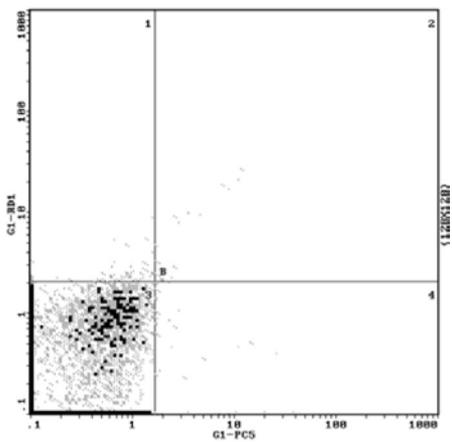
- Считайте данные, используя двупараметровую диаграмму CD45-FITC (FL1 LOG) – SS (90°LS). Возможно, деление лейкоцитов на три субпопуляции будет достаточно очевидным. Создайте гейт вокруг популяции лимфоцитов, имеющих яркую флуоресценцию CD45+ FITC и низкие величины SS (см. рисунок 1).

**Рисунок 1. Двупараметровая диаграмма CD45-FITC (FL1 LOG) – SS (Светорассеяние в боковом направлении) для идентификации лимфоцитов (Гейт А).**



2. Для изотипического контроля создайте двупараметровую диаграмму MslgG1-RD1 (FL2 LOG) и MslgG1-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) с использованием гейта лимфоцитов (см. рисунок 2). Квадранты устанавливаются так, чтобы 98% (номинально) неспецифического окрашивания попало в квадрант 3.

**Рисунок 2. Двупараметровая диаграмма MslgG1-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) – MslgG1-RD1 (FL2 LOG), в качестве гейта используется популяция лимфоцитов (Гейт А). Квадранты устанавливаются так, чтобы 98% (номинально) неспецифического окрашивания попало в квадрант 3.**



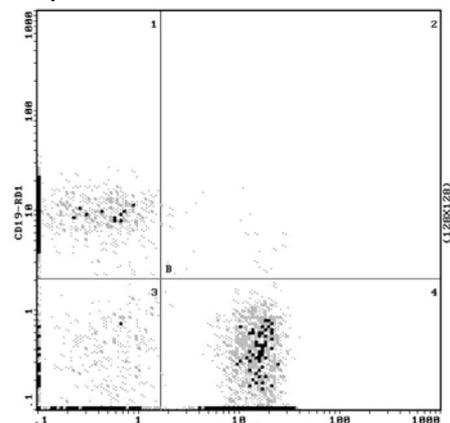
3. Для анализа образцов используйте квадранты, установленные с помощью изотипического контроля. Постройте двупараметровую диаграмму CD19-RD1 (FL2 LOG) – CD3-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG), где в качестве гейта используется популяция лимфоцитов (см. рисунок 3).

Данные диаграммы получены при анализе образца цельной крови, окрашенного реагентом CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/ MslgG1-RD1/ MslgG1-PC5 (рисунок 2) и реагентом CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 (рисунок 3), лизированного с помощью набора реагентов COULTER IMMUNOPREP и станции прободготовки COULTER MULTI-Q-PREP и проанализированного на проточном цитофлуориметре COULTER EPICS XL/XL-MCL (с 4 датчиками флуоресценции), при этом в качестве гейта использовалась популяция лимфоцитов. Квадранты были установлены с помощью изотипического контроля так, чтобы включить 98% (номинально) неспецифически окрашенных клеток в третий квадрант.

На рисунке 3 показана диаграмма, позволяющая вычислить процентное содержание клеток CD3+ путем сложения значений в квадрантах 2 и 4. Процентная доля

CD3-/CD19+ клеток прямо определяется содержанием клеток в квадранте 1.

**Рисунок 3. Двупараметровая диаграмма CD3-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) – CD19-RD1 (FL2 LOG), в качестве гейта используется популяция лимфоцитов (Гейт А). Квадранты устанавливаются с помощью изотипического контроля.**



### ПОДСЧЕТ АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК

Подсчет абсолютного количества клеток может быть выполнен двумя способами. При стандартном (непрямом) методе подсчета используются результаты гематологического исследования и исследования, выполненного методом проточной цитометрии. Для подсчета используется следующая формула:

$$\text{Абсолютное количество клеток (клеток/мкл)} = \frac{\text{Общее количество лейкоцитов (клеток/мкл)} \times \% \text{ лимфоцитов} \times \% \text{ положительно окрашенных клеток}}{10^4}$$

При прямом методе подсчета используются флуоросферы Flow-Count. Подсчет абсолютного количества клеток выполняется по следующей формуле:

$$\text{Абсолютное количество клеток (клеток/мкл)} = \frac{\text{Общее количество клеток интересующей популяции} \div \text{Общее количество флуоросфер Flow-Count}}{\text{Определенная концентрация флуоросфер Flow-Count}}$$

### ОГРАНИЧЕНИЯ

- Для получения наиболее точных результатов образцы должны быть окрашены в течение 6 часов после отбора. До начала окрашивания и анализа образцы должны оставаться в пробирках для отбора крови при комнатной температуре. Не охлаждайте образцы. Охлаждение образцов может привести к получению неверных результатов.
- Чтобы свести к минимуму вероятность получения недостоверных результатов, анализируйте образцы сразу после окрашивания.
- Рекомендуемая жизнеспособность клеток для образцов венозной крови составляет  $\geq 90\%$ , однако при некоторых аномалиях это значение труднодостижимо.
- Длительное воздействие на клетки литического агента может привести к разрушению лейкоцитов и потере клеток интересующей вас популяции.
- Лизис эритроцитов может быть неполным в следующих случаях: при наличии ядерных эритроцитов, при аномальной концентрации белка и при гемоглобинопатиях. Это может привести к получению заниженных результатов вследствие того, что эритроциты, не подвергшиеся лизису, будут подсчитаны как лейкоциты.
- Данный реагент предназначен для подготовки образцов цельной крови. Его можно использовать с лиофилизированным препаратом контрольных клеток COULTER

CYTO-TROL. Не рекомендуется использовать данный реагент со свежеприготовленными или замороженными препаратами моноуклеарных клеток.

- Данный реагент нельзя разводить, разделять на аликвоты или замораживать. Используйте реагент только в том виде, в котором он поставляется.
- Данный реагент предназначен для использования только в проточной цитометрии.
- Патологические состояния организма не всегда сопровождаются аномальным изменением процентного содержания определенных популяций лейкоцитов. Процентное содержание популяций лейкоцитов у больного человека может быть таким же, как и у здорового. При интерпретации результатов теста следует учитывать общую клиническую картину и другие диагностические данные.
- Образцы некоторых пациентов могут представлять определенную проблему для анализа в связи с измененным или очень малым количеством клеток в некоторых популяциях.
- Для некоторых пациентов, проходящих терапию ОКТ3, могут быть получены недостоверные результаты при использовании моноклональных антител CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5.<sup>44-46</sup>
- При неправильной настройке лазера или неправильной установке гейтов могут быть получены недостоверные результаты цитофлуориметрического анализа.
- Ввиду того, что при использовании различных методов определения абсолютного количества лимфоцитов наблюдается недопустимая вариативность результатов, необходимо выполнить оценку точности используемого метода.<sup>47</sup>

### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Образцы цельной крови были отобраны у практически здоровых мужчин и женщин. Исследуемая популяция была территориально рассредоточена и включала людей из восточной, центральной и западной части Соединенных штатов в возрасте 19-84 лет (n = 166: 19-84 лет; n = 1: возраст неизвестен). Раса при проведении исследования не учитывалась. Образцы окрашивались моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5. Исследование выполнялось методом проточной цитометрии (с помощью проточного цитофлуориметра COULTER EPICSXL-MCL; в качестве гейта использовалась популяция лимфоцитов). Результаты подсчета общего количества клеток CD3+ и CD19+ приводятся в следующей таблице. Для каждого образца выполнялся подсчет общего количества и пяти субпопуляций лейкоцитов. Подсчет абсолютного количества выполнялся прямым методом (с использованием флуоросфер Flow Count). Полученные значения приведены в процентах (%) от общего количества лимфоцитов и в единицах абсолютного подсчета (клеток/мкл).

**Эти значения приводятся только в качестве примера. Каждая лаборатория должна установить собственные диапазоны нормальных значений на основании исследования образцов здоровых доноров местной популяции.**

#### ОБРАЗЦЫ НОРМАЛЬНОЙ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ % + лимфоцитов

	n	Минимум	Максимум	Среднее $\pm 1SD$
CD3+	167	39.3	93.0	72.1 $\pm$ 8.4
CD19+	167	1.8	43.4	14.4 $\pm$ 6.5

#### Абсолютное количество

	n	Минимум	Максимум	Среднее $\pm 1SD$
CD3+	167	418	3108	1365 $\pm$ 490
CD19+	167	25	1177	286 $\pm$ 191

## СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD45 экспрессируется всеми типами гемопоэтических клеток за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников.<sup>14,15</sup> Этот антиген не был обнаружен в дифференцированной негемопоэтической ткани.<sup>14-17</sup>

Антиген CD19 экспрессируется на всех В-клетках, включая ранних предшественников В-клеток.<sup>3</sup> Экспрессия CD19 сохраняется на всех стадиях созревания и прекращается только на конечной стадии дифференцировки в плазматическую клетку.<sup>1,18</sup> Также этот антиген присутствует на фолликулярных дендритных клетках и клетках-предшественниках миеломоноцитарной линии, но отсутствует на Т-клетках, моноцитах и гранулоцитах.<sup>1,19,20</sup>

Антиген CD3 в норме присутствует на поверхности зрелых тимоцитов, а также покоящихся и активированных Т-лимфоцитов периферической крови (как индукторов, так и супрессоров/цитотоксических клеток).<sup>22-24</sup>

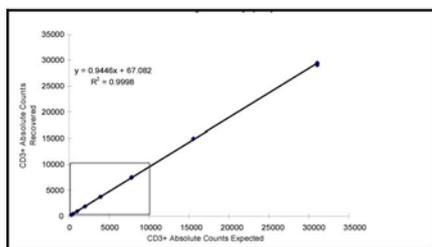
Для оценки клеточной перекрестной реактивности с помощью моноклональных антител CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 было проведено исследование нормальных образцов крови взрослых доноров. Полученные результаты показали, что моноклональные антитела к CD3 и CD19 специфически реагируют с соответствующими популяциями лимфоцитов.

В разделе «ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА» описывается, как проверить специфическое и неспецифическое окрашивание клеток моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5.

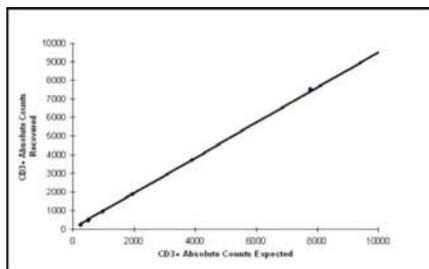
### ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для оценки диапазона концентраций CD3+ и CD19+ лимфоцитов было выполнено 10 последовательных разведений концентрата контрольных клеток COULTER CYTO-TROL. Для каждого разведения исследование выполнялось трижды. Клетки были окрашены моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 и проанализированы методом проточной цитометрии (на проточном цитофлуориметре COULTEREPICS XL-MCL; в качестве гейта использовалась популяция лимфоцитов). См. графики, приведенные ниже. Значения приведены в единицах абсолютного подсчета (количество клеток/мкл).

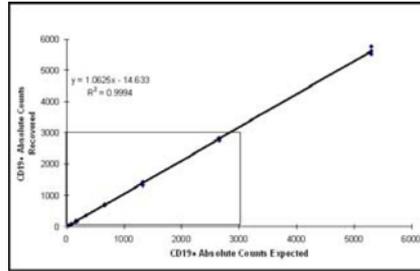
### Полный диапазон определения CD3+ лимфоцитов



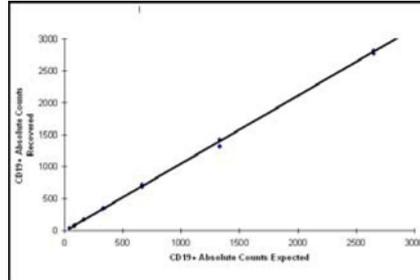
### Увеличение нижней части диапазона определения CD3+ лимфоцитов



### Полный диапазон определения CD19+ лимфоцитов



### Увеличение нижней части диапазона определения CD19+ лимфоцитов



### ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

Была исследована степень согласованности результатов, полученных с использованием реагента CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 и реагента CYTO-STAT/COULTER CLONE® CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1. Использовались лизированные образцы нормальной и аномальной цельной крови. Исследование выполнялось методом проточной цитометрии (с помощью проточного цитофлуориметра COULTER EPICS XL-MCL, гейтированного на популяцию лимфоцитов). Ниже, в таблице и на рисунках, приводятся данные, подтверждающие предположение об эквивалентной реактивности реагентов по отношению к зрелым Т- и НК-лимфоцитам периферической крови. Результаты представлены в процентах (%) от общего количества лимфоцитов. Значения для CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1 были откорректированы с учетом чистоты гейта лимфоцитов (ограничения для гейта лимфоцитов: полнота включения лимфоцитов ≥90% и чистота >85%).

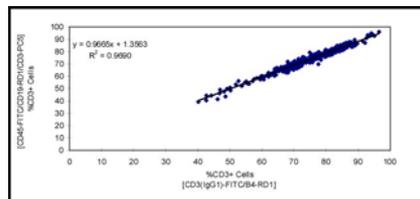
Реагент	n	% CD3+ лимфоцитов		
		Мини-мум	Макси-мум	Среднее ± 1SD
CD3-FITC/B4-RD1	341	40.2	96.5	74.2 ± 10.2
CD45/CD19/CD3	341	39.3	96.1	73.0 ± 10.0

Реагент	n	% CD19+ лимфоцитов		
		Мини-мум	Макси-мум	Среднее ± 1SD
CD3-FITC/B4-RD1	341	0.1	46.7	13.4 ± 7.4
CD45/CD19/CD3	341	0.3	50.6	13.6 ± 7.5

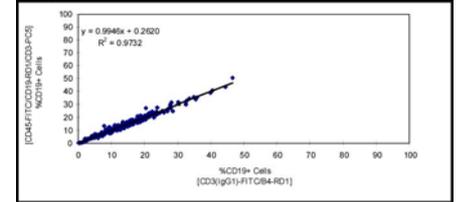
Общее процентное содержание лимфоцитов	n		
	Минимум	Максимум	Среднее ± 1SD
341	78.1	100.9	95.3 ± 3.1

Где общее процентное содержание лимфоцитов = %CD3+(Т-лимфоциты)\* + %CD19+(В-лимфоциты) + %CD3-/CD56+(НК-лимфоциты)  
 \*%CD3+ = Среднее пробирок CD3.

### Регрессионный анализ: CD3+ лимфоциты



### Регрессионный анализ: CD19+ лимфоциты



### ПОГРЕШНОСТЬ

#### В пределах цикла исследования (внутрилабораторная)

С помощью проточного цитофлуориметра COULTER EPICS XL-MCL было выполнено определение концентрации лимфоцитов CD3+ и CD19+ трех уровней. Для каждого уровня концентрации измерение выполнялось десять раз. Для получения образцов различных уровней был выполнен скрининг нормальных образцов цельной крови. Клетки окрашивались реагентом CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5. Результаты представлены в виде процентного содержания (%) от общего количества лимфоцитов.

Уровень	n	Среднее % CD3+	± 1SD	Кoeffициент вариации (CV)
1	10	80.8	0.61	0.76
2	10	83.2	0.62	0.75
3	10	64.6	0.77	1.19

Уровень	n	Среднее % CD19+	± 1SD	Кoeffициент вариации (CV)
1	10	7.5	0.50	6.71
2	10	10.0	0.47	4.67
3	10	17.7	0.52	2.95

#### Межлабораторная

Исследования выполнялись в один и тот же день в трех лабораториях корпорации Coulter на трех разных цитометрах. На каждом приборе измерение выполнялось десять раз. Для всех исследований использовался один образец крови, взятой у здорового донора. Образец был разделен на три части, и все три лаборатории выполнили окрашивание своей части образца моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5. Результаты были представлены в процентах (%) от общего количества лимфоцитов. В таблице приводится погрешность для отдельных лабораторий и суммарная погрешность.

Лаборатория/Прибор	n	Среднее % CD3+	± 1SD	Кoeffициент вариации (CV)
1 EPICS XL	10	75.1	0.97	1.29
2 EPICS XL	10	77.5	0.95	1.22
3 Profile™	10	72.9	0.76	1.04
Суммарно	30	75.2	2.12	2.82

Лаборатория/Прибор	n	Среднее % CD19+	± 1SD	Кoeffициент вариации (CV)
1 EPICS XL	10	13.3	0.69	5.17
2 EPICS XL	10	12.6	0.66	5.23
3 Profile™	10	13.0	0.58	4.48
Суммарно	30	13.0	0.70	5.37

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. 1995. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 262, 263, 268, 270, 507-511, 1398-1400.
- Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. Leukocyte Typing. 1984. Springer-Verlag, New York; pp. 28, 41-42, 44, 196.
- McMichael AJ, ed. 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, 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. 1996. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive

- human natural killer cell leukemia. *Experimental Hematology* 24:406-415.
5. 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, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegal FP, Stjernsward J, Terry WD and Wybran J. 1975. Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. *International Union of Immunological Societies (IUIS), Report - July 1974. Clin Immunol and Immunopathol* 3:584-597
  6. Foon KA and Todd RF. 1986. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68:1-31.
  7. Hercend T, Meuer SC, Reinherz EL, Schlossman SF and Ritz J. 1982. Generation of a cloned NK cell line derived from the "null cell" fraction of human peripheral blood. *J Immunol* 129:1299-1305.
  8. Mishell B, Shiigi S eds. 1980. *Selected Methods in Cellular Immunology*. New York: WH Freeman and Co., pp 69-123.
  9. Drexler HG, Gignac SM, and Miniwada J. 1988. Routine immunophenotyping of acute leukemias. *Blut* 57:327-339.
  10. Robertson MJ, Ritz J. 1990. Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells. *Blood* 76:2421-2438.
  11. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, and Bernstein ID. 1986. *Leukocyte Typing II*. New York: Springer-Verlag, Vol 2: pp 8, 15-25, 37.
  12. Newman, W Targan SF, and Fast LD. 1984. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. *Mol Imm* 21:1113-1121
  13. Fabre JW and Williams AF. 1997. Quantitative serological analysis of a rabbit anti-rat lymphocyte serum and preliminary biochemical characterization of the major antigen recognized. *Transplantation* 23:349-359
  14. Coffman RL and Weissman IL. 1981. B220: A B cell specific member of the T-200 glycoprotein family. *Nature* 289:681-693
  15. Dalchau R and Fabre JW. 1980. Identification with a monoclonal antibody of predominantly B lymphocyte specific determinant of the human leucocyte common antigen. *J Exp Med* 153:753-757
  16. Omary MB, Trowbridge IS and Battifora HA. 1980. Human homologue of murine T-200 glycoprotein. *J Exp Med* 152:842-852
  17. Dalchau R, Kirkley J and Fabre JW. 1981. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte common (L-C) antigen of rat. *Eur J Immunol* 10:737-744
  18. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF, Schlossman SF. 1983. B4, human B lymphocyte associated antigen expressed on normal, mitogen activated and malignant B lymphocytes. *J Immunol* 131:244-250
  19. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Samoja C, Williams AF eds. 1993. *The Leucocyte Antigen Facts Book*. London: Academic Press, pp. 106-109.
  20. Tedder TF and Isaacs CM. 1989. Isolation of a cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes: a new member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 143:712-717.
  21. Tedder TF, Inaoki M and Sato S. 1997. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 6:107-118.
  22. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19:821-827.
  23. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. *Cell* 30:735-743.
  24. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL. 1983. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. *Nature* 303:808-810.
  25. Benjamini E and Leskowitz S. *Immunology: A Short Course*. Second Edition. 1991. New York: Wiley-Liss 211-244.
  26. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF. 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. *J Immunol* 125:1269-1274.
  27. Felsenstein D, Carney WP, Iacoviello VR and Hirsch MS. 1985. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus-induced mononucleosis. *J Infect Dis* 152:198-203.
  28. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL. 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. *Infect Immun* 40:472-477.
  29. 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. 1982. New York, NY: Academic Press, pp. 39-70.
  30. Schmidt RE: 1989. Monoclonal antibodies for diagnosis of Immunodeficiencies. *Blut*:59:200-206.
  31. de Martini RN and Parker JW: 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. *J Clin Lab Anal* 3:56-70
  32. Fauci AS: 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. *Science* 239:617-622.
  33. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV: 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. *J AIDS* 2:114-124.
  34. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM. 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. *Blood* 74:2203-2211.
  35. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, Van Leeuwen E, Capel PJA and Haanen C. 1989. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WT1-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Blood* 74:1152-1158.
  36. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB. 1989. 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* 47:465-471.
  37. Centers for Disease Control and Prevention. 1997 Revised guidelines for performing CD4+ T-Cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR* 1997; 46 (No. RR. 2): 1-29.
  38. Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, and von dem Borne AEGKR., eds. 1989. *Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens*. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 22, 36-38.
  39. Pesando JM, Stuck M and Hoffman P. 1987. Altered expression of surface antigens with appearance of HLA class II molecules on a human malignant B-cell line. *Human Immunology* 19:235-243.
  40. Beverley PCL and Callard RE. 1981. Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cells antibody. *Eur J Immunol* 11:329-334.
  41. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture*, Approved Edition (H3). Clinical and Laboratory Standards Institute.
  42. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA. 1990. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry* 11:453-459.
  43. Nicholson JKA, Hubbard M and Jones BM. 1996. 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)* 26:16-21.
  44. Gebel HM, Lebeck LL, Jensik SC, Landay AL and Bray RA. 1989. Discordant expression of CD3 and T-cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated with OKT3. *Transplantation Proceedings* 1:1745-1746.
  45. 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, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H and Kr. von dem Borne AEG, eds. 1989. Oxford: Oxford University Press, pp. 295-296.
  46. Schroeder TI and Chatenoud L: Immunological monitoring during treatment with OKT3. Presented under the auspices of the American Society of Transplant Surgeons.
  47. Koepke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. *Clin Immunol Immunopathol* 52:19-27.

### ЗАКАЗ РЕАГЕНТОВ

Реагент CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5  
Каталожный номер 6607072 – 50 тестов (0.5 мл)

Флуорохром RD1 защищен патентом 4,520,110.  
Флуорохром PC5 защищен патентами 4,520,110 и 4,542,104.  
Флуорохром Cy5 защищен патентами 4,981,977 и 5,268,486.

Для получения дополнительной информации, а также при доставке вам поврежденного товара обратитесь в службу поддержки пользователей компании Beckman Coulter (по телефону 800-526-7694 в США и Канаде) или свяжитесь с вашим представителем компании Beckman Coulter.

### ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER, COULTER CLONE, CYTO-COMP, CYTO-STAT, CYTO-TROL, EPICS, Flow-Count, IMMUNOPREP, MULTI-Q-PREP, Profile, Q-PREP, TQ-Prep, triCHROME, XL и XL-MCL являются торговыми знаками компании Beckman Coulter, Inc.



Beckman Coulter, Inc.  
4300 N. Harbor Blvd.  
Fullerton, CA 92835  
[www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)



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

Распечатано в России  
Изготовлено в США

© 2008 Beckman Coulter, Inc.  
Все права защищены.