



CD10 (HI10a)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD10

Форма	Номер по каталогу
FITC	332775
PE	332776
PE-Сy7	341112
APC	332777

06/2018

23-13697-03



© 2018 BD. BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company.



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited
14b George Bourke Drive
Mt Wellington
Auckland 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD10 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD10, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYS™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD10 в исследовании гематологической неоплазии.^{1,2}

2. СОСТАВ

CD10, клон HI10a³, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных бластными клетками пациента, страдающего острым лимфобластным лейкозом. CD10 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	12,5 мкг в 1,0 мл PBS	12,5
PE	6 мкг в 1,0 мл PBS	6
PE-Сy7 ^{7b}	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25
APC	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25

а. Конц. = концентрация

- b. Су™ — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: $\leq 5\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PE-Cy7, APC: $\leq 20\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Храните пузырьки с антителами в сухой среде.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ МАТЕРИАЛЫ

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные

- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- BD FACST™ lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азид натрия
- Раствор BD CellFIX™ (номер по каталогу 340181) или 1%-ный раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азид натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{4,5}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁴.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{6,7} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD10. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200g в

течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.

7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты PE-Cy7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

Аналитические результаты

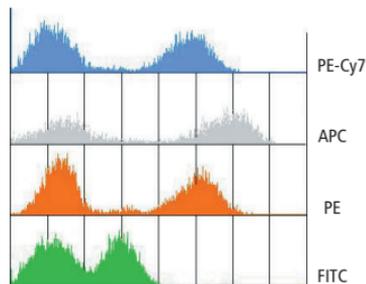
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на мешалке «вортекс» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их обработкой на проточном цитометре⁸. Перед сбором образцов отрегулируйте пороговое значение, чтобы максимально исключить клеточные обломки и убедиться, что интересные популяции вас популяции включены. Соберите и проанализируйте данные пациентов, собранные в виде списка, с помощью соответствующего программного обеспечения. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на лейкоцитах перифериче-

ской крови с добавлением RЕН-клеток и гейтированные по лимфоцитам (включая RЕН-клетки). Возбуждение лазером проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ beads и программное обеспечение BD FACSComp™ software, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации частиц *BD Calibrite Beads* и Руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы⁹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD10 (Anti-CALLA) распознает общий антиген острого лимфобластного лейкоза человека (CALLA) с молекулярным весом 100 килодальтон (кДа)^{3,10}. Антиген CD10 идентичен нейтральной эндопептидазе, ассоциированной с мембраной человека (NEP; EC 3.3.24.11), также известной как энкефалиназа¹¹.

Антиген CD10 обнаружен на лимфоцитах образцов с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (В-ALL)¹². Антиген также присутствует на множестве типов нормальных и неопластических клеток, включая почечный эпителий, фибробласты, гранулоциты и некоторые Т-клеточные лейкомии¹³, клеточные линии лимфомы, меланомы и глиомы¹¹.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение популяции CD10⁺ от популяции CD10⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделения CD10⁺ от CD10⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация разлива антител для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность в разрешении клеток CD10⁺ от соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD10 был представлен на рассмотрение на Пятом международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон HI10a в составе слепой панели анти-

тел и сообщили согласующиеся результаты³.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов.

При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI REH-клеток по разным партиям и многим донорам (N)

	№а	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	3	81,6	2,48	3,04
PE	3	602,2	16,89	2,81
PE-Cy7	3	353,0	15,92	4,51
APC	3	398,5	33,52	8,41

а. N = количество образцов

б. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). В случае частичного перекрытия популяций, на расчет процента клеток, положительных по какому-либо маркеру, может повлиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реа-

гентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоემий и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов⁵.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в совокупности с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, с добавлением ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на производные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или бледная окраска	Концентрация клеток слишком высока на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством анти-тел.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arber DA, Weiss LM. CD10: a review. *Appl Immunohistochem*. 1997;5:125-140.
- Pui CH, Rivera GK, Hancock ML, et al. Clinical significance of CD10 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1993;7:35-40.
- Zola H. CD10 Workshop Panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:505-507.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
- Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
- Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
- Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
- Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
- Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
- Greaves MF. Monoclonal antibodies as probes for leukemic heterogeneity and hematopoietic differentiation. In: Knapp W, ed. *Leukemia Markers*. New York, NY: Academic Press; 1981:19.
- Letarte M, Vera S, Tran R, et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med*. 1988;168:1247-1253.
- LeBien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10): emancipation from a functional enigma. *Blood*. 1989;73:625-635.
- Consolini R, Legitimo A, Rondelli R, et al. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. *Haematologica*. 1998;83:967-973.



CD34 (8G12)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD34.

Форма	Номер по каталогу
FITC	345801
PE	345802
PerCP	345803
PerCP-Cy5.5	347222
PE-Cy7	348811
APC	345804

3/2018

23-13703-05



© 2018. BD, BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company.



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited
14b George Bourke Drive
Mt Wellington
Auckland 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD34 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD34, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYS™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD34 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻⁵.

2. СОСТАВ

CD34 (Anti-HPCA*⁻²), клон 8G12, получен гибридизацией клеток мышинной миеломы Sp2/0-Ag14 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клеточной линией человека KG-1a. CD34 состоит из мышинных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC	50 мкг в 2,0 мл PBS	25
PE	50 мкг в 2,0 мл PBS	25
PerCP	50 мкг в 1,0 мл PBS	50
PerCP-Cy™5.5 ^b	12,5 мкг в 1,0 мл PBS	12,5

* Антиген человеческой клетки-предшественника

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
PE-Су TM 7	25 мкг в 0,5 мл PBS	50
APC	50 мкг в 0,5 мл PBS	100

а. Конц. = концентрация

б. СуTM — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготовляется и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия на использование этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC: ≤20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °С до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®[†] или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACSTM lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASHTM (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия.
- Раствор BD CellFIXTM (номер по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °С.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{6,7}.

[†] Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за потери необходимых популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁶.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{8,9} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки. Известно, что фиксация инактивирует ВИЧ.¹⁰

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD34. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкуби-

руйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.

5. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты PE-Cy7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

Аналитические результаты

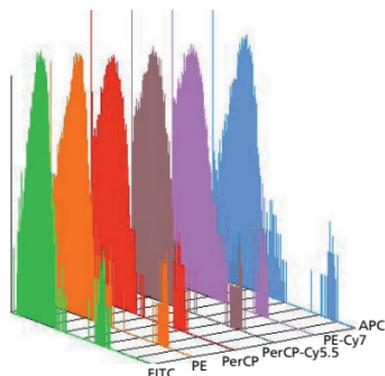
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или аберрантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр.¹¹ Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программ-

ного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на образце лейкофереза и гейтированные по лимфоцитам. Обратите внимание, что ось Y приведена в логарифмическом масштабе. Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и Руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здоро-

вого взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы¹².

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Антиген CD34 — это трансмембранный гликопротеин с одной цепью и молекулярной массой от 105 до 120 килодальтон (кДа). Он экспрессируется в незрелых кроветворных клетках-предшественниках и во всех кроветворных колониеобразующих клетках костного мозга и крови. Антиген CD34 также обнаружен в капиллярных эндотелиоцитах и приблизительно у 1 % человеческих тимоцитов. Нормальные лимфоциты периферической крови, моноциты, гранулоциты и тромбоциты не экспрессируют антиген CD34.

Антиген CD34 экспрессируется приблизительно в 60 % В-клеточных острых лимфоидных лейкозов и острых миелоидных лейкозов (AML) и 1–5 % Т-клеточных острых лимфоидных лейкозов.^{3,5,13} Данный антиген не экспрессируется при хронических лимфоидных лейкозах или лимфомах.¹³

Чувствительность

Чувствительность определяется как максимальная интенсивность окрашивания популяции CD34⁺. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на клетках KG-1a. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) CD34⁺ определялась для каждого образца и усреднялась по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при обнаружении CD34⁺. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD34 был представлен на рассмотрении на Пятом международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон 8G12 как часть скрытой панели анти-тел и сообщили согласующиеся друг с другом результаты.¹⁴

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) для разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI клеток KG-1a по разным партиям и многим маркированным здоровым донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	23	812,2	127,50	15,70
PE	29	1620,7	281,43	17,36
PerCP	12	542,3	44,98	8,30
PerCP-Cy5.5	3	4984,6	287,38	5,77
PE-Cy7	3	2937,3	489,77	16,67
APC	3	4251,3	1068,68	25,14

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). Когда популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов⁷.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Неадекватные параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.

Проблема	Возможная причина	Решение
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmidt CJ, Domenico L, Ward P, Barcos MP, Stewart CC. Aberrant antigen expression detected by multiparameter three color flow cytometry in intermediate and high grade B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 1999;34:539-544.
- Kobbe G, Sohngen D, Bauser U, et al. Factors influencing G-CSF-mediated mobilization of hematopoietic progenitor cells during steady-state hematopoiesis in patients with malignant lymphoma and multiple myeloma. *Ann Hematol*. 1999;78:456-462.
- Terstappen LW, Safford M, Könemann S, et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia*. 1992;6:70-80.
- Waller EK, Barlett N, Chen C-H, et al. Variations in the content of CD34+ cells in the peripheral blood of cancer patients receiving out-patient chemotherapy. *Cytotherapy*. 1999;1:21-29.
- Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, et al. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1988;72:299-307.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
- Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
- Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
- Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other

- bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
10. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993;160:215-218.
 11. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
 12. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
 13. Civin CI, Trischmann TM, Fackler MJ, et al. Report on the CD34 cluster workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:818-825.
 14. Greaves MF, Titley I, Colman SM, et al. CD34 cluster workshop report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:1:840-846.



CD16 (3G8)

Реагент моноклональных мышиных антител к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD16

Форма
PerCP-Cy5.5

Номер по каталогу
338440

5/2017

23-13762-03



© BD, 2017. BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company.



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited
14b George Bourke Drive
Mt. Wellington
Auckland 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

CD16 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD16, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также оснащен необходимым аналитическим программным обеспечением (таким как BD CellQuest™ или BD LYSYS™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Сферы применения

Экспрессия CD16 в исследовании гематологической неоплазии^{1, 2}

2. СОСТАВ

CD16, клон 3G8, получен путем слияния РЗU1-клеток мышиной миеломы со спленоцитами мышей CD₂F₁³. CD16 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного иммуноглобулина IgG₁.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS), содержащем желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в Табл. 1.

Табл. 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
PerCP-Cy5.5 ^б	6 мкг в 1,0 мл PBS	6

- a. Конц. = концентрация
- b. Cy™ — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Карнеги-Меллон (Carnegie Mellon University), изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным компании BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- PerCP-Cy5.5: ≤ 20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока годности, указанного на этикетке. Не используйте после истечения срока годности. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите флаконы с реагентами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки Falcon®* или аналогичные.
- Микропипетка с наконечниками.
- Мешалка «вортекс».
- Лизирующий раствор BD FACST[™] Lysing Solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в инструкции по эксплуатации.
- Центрифуга.
- Раствор BD CellWASH[™] (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия.

- Раствор BD CellFIX[™] (номер по каталогу 340181) или 1%-ный раствор параформальдегида в PBS, содержащем 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Информацию см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{4, 5}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁴.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращаясь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{6, 7} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в 12 x 75-мм полистирольной пробирке добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD16.

Относительно объема см. соответствующую маркировку флакона.

2. Аккуратно встряхните на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл лизирующего раствора 1X BD FACS Lysing Solution.
4. Аккуратно встряхните на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-ного раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

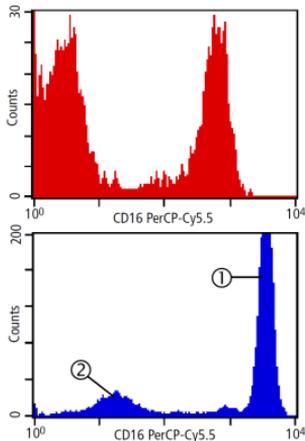
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или аберрантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на «вортексе» на низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их обработкой на проточном цитометре⁸. Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме при помощи соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция включена. На Рис. 1 представлены репрезентативные данные, полученные на лизированной цельной крови, гейтированной по лимфоцитам (Рис. 1 сверху), гранулоцитам и моноцитам (Рис. 1 снизу). Лазерное возбуждение проводилось при длине волны 488 нм.

Рис. 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



№	Описание
1	гранулоциты
2	моноциты

Внутренний контроль качества

Рекомендуется использовать гранулы BD Calibrite™ Beads и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и *BD FACSComp Software User's Guide* (Руководство пользователя программного обеспечения BD FACSComp).

Рекомендуется ежедневно обрабатывать контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации параметров прибора и контроля качества системы⁹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Антитела CD16 распознают антиген массой 50–65 килодальтон (кДа), присутствующий на человеческих естественных клетках-киллерах (КК), который является рецептором типа III фрагмента Fc иммуноглобулина IgG¹⁰.

Антиген CD16 экспрессируется приблизительно на 15 % лимфоцитов периферической крови и присутствует практически на всех остальных покоящихся естественных лимфоцитах-киллерах¹⁰. У некоторых лиц антиген CD16 может экспрессироваться на CD3⁺ Т-лимфоцитах¹¹. Антиген CD16 также экспрессируется на нейтрофилах¹². Переменное количество лимфоцитов CD16⁺ коэкспрессируют антиген CD57, антиген CD8 низкой плотности или оба^{12–14}. Естественные клетки-киллеры CD16⁺CD56⁺ характеризуются обратным переносом состояния активации с дендритными клетками¹⁵.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD16⁺ и CD16⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD16⁺ и CD16⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD16⁺ и соответствующих отрицательных. См. Табл. 1.

Воспроизводимость

CD16 был представлен на рассмотрение на Четвертой международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон 3G8 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся результаты¹⁶.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано усредненное значение средней интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в Табл. 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные среднеквадратические отклонения (CO) определяли по парным результатам для каждого образца. Индивидуальные CO группировали для выведения объединенного CO для каждого реагента, что обеспечивало оценку повторяемости внутри выборки.

Табл. 2. Повторяемость MFI CD16+ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№а	Среднее значение MFI	Объединенное CO	Объединенный % KB ^b
PerCP-Cy5.5	11	97 291,2	18 089,66	18,59

а. N = количество образцов

б. KB = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают лучшее разделение, чем конъюгаты с другими красителями (FITC, PerCP). Если популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов от пациентов, подвергающихся подобному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитарных и лимфоцитарных образцов. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов⁵.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения соответствия количества и содержания, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или подразумеваемых, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения чьих-либо прав. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделия либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток; центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры прибора	Следуйте соответствующей методике настройки прибора; при необходимости оптимизируйте настройки.

Проблема	Возможная причина	Решение
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scott CS, Richards SJ. Classification of large granular lymphocyte (LGL) and NK-associated (NKa) disorders. *Blood Rev.* 1992;6:220-233.
2. Loughran TP, Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood.* 1993;82:1-14.
3. Fleit HB, Wright SD, Unkeless JC. Human neutrophil Fcγ receptor distribution and structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79:3275-3279.
4. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
5. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P, Jr., Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry.* 1997;30:214-230.

6. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
7. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
8. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
9. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
10. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
11. Lanier LL, Kipps T, Phillips JH. Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J Exp Med*. 1985;162:2089.
12. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol*. 1983;131:1789-1796.
13. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1984;133:180-189.
14. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol*. 1983;130:2133-2141.
15. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;195:327-333.
16. Schmidt RE, Perussia B. Cluster report: CD16. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:575-578.



CD5 (L17F12)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD5

Форма	Номер по каталогу
FITC	345781
PE	345782
PerCP-Cy5.5	341109
PE-Cy7	348810
APC	345783

5/2017

23-13695-05



© BD, 2017. BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company.



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited
14b George Bourke Drive
Mt Wellington
Auckland 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD5 предназначен для диагностической идентификации in vitro клеток, экспрессирующих антиген CD5, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYSTM II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD5 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻³

2. СОСТАВ

CD5, клон L17F12,⁴ получен путем гибридизации клеток мышинной миеломы NS-1/Ag4 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированными человеческими клетками острого Т-лимфобластного лейкоза (ALL). CD5 состоит из тяжелых цепей иммуноглобулина мыши IgG_{2a} и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC	10 мкг в 2,0 мл PBS	5
PE	12,5 мкг в 2,0 мл PBS	6,25
PerCP-Cy™5,5 ^b	3 мкг в 1,0 мл PBS	3
PE-Cy™7	3 мкг в 0,5 мл PBS	6
APC	3 мкг в 0,5 мл PBS	6

- a. Конц. = концентрация
- b. Су™ — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: $\leq 5\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC: $\leq 20\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Храните пузырьки с антителами в сухой среде.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ МАТЕРИАЛЫ

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- BD FACST™ lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- Раствор BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- Раствор BD CellFIX™ (номер по каталогу 340181) или 1%-ный раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть рассмотрены до отбора образцов и анализа.^{5,6}

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁵.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{7,8} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD5. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкуби-

руйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.

5. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты PE-Cy7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

Аналитические результаты

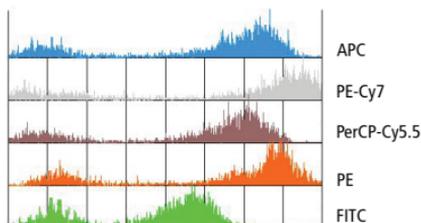
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или аберрантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других релевантных антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на мешалке «вортекс» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их обработкой на проточном цитометре⁹. Перед сбором образцов отрегулируйте пороговое значение, чтобы максимально исключить кле-

точные обломки и убедиться, что интересующие популяции вас популяции включены. Соберите и проанализируйте данные пациентов, собранные в виде списка, с помощью соответствующего программного обеспечения. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на цельной крови и гейтированные по лимфоцитам и гранулоцитам. Возбуждение лазером проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать частицы BD Calibrite™ beads и программное обеспечение BD FACSComp™ software, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации частиц *BD Calibrite Beads* и Руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы¹⁰.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Антиген CD5 присутствует приблизительно на 70 % нормальных лимфоцитов периферической крови и практически на всех Т-лимфоцитах в тимусе и периферической крови^{4,11,12}. Антитело CD5 реагирует с большинством клеток в Т-лимфоцитарных областях селезенки и лимфатических узлов, а также со многими Т-клеточными лейкозами и лимфомами^{1,2,13}. Оно также реагирует с определенным подмножеством нормальных В-лимфоцитов¹⁴, отдельными клетками в В-лимфоцитарных областях селезенки и лимфатических узлов¹³ и большинством клеток Ig⁺ В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза (В-CLL)^{2,3}. Некоторые лимфомы также экспрессируют антиген CD5¹.

Реагент CD5 распознает антиген Т-лимфоцитов человека с молекулярным весом 67 килодальтон (кДа)¹⁵.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение популяции CD5⁺ от популяции CD5⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделения CD5⁺ от CD5⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация разлива антител для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность в разрешении клеток CD5⁺ от соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD5 был представлен на рассмотрении на Втором международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Second International Workshop and Conference on

Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон L17F12 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся результаты¹⁶.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по паре результатов для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI CD5⁺ лимфоцитов в цельной крови по разным партиям и многим донорам (N)

	№ ^a	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	24	157,5	10,96	6,96
PE	31	844,1	86,85	10,29
PerCP-Cy5.5	3	1711,2	48,42	2,83
PE-Cy7	3	1020,8	222,68	21,81
APC	7	1328,9	53,25	4,01

- a. N = количество образцов
b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP). В случае частичного перекрытия популяций, на расчет процента клеток, положитель-

ных по какому-либо маркеру, может повлиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся данному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоemий и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реактивов⁶.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в совокупности с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, с добавлением ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе, в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмеще-

НИЕМ ПОКУПНОЙ ЦЕНЫ. КОМПАНИЯ BD НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА МАТЕРИАЛЬНЫЙ УЩЕРБ ИЛИ ЛЮБЫЕ СЛУЧАЙНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ, ВКЛЮЧАЯ ТРАВМЫ ИЛИ ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОТЕРИ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗДЕЛИЕМ.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедуре настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком высока на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Warnke R, Miller R, Grogan T, Pederson M, Dille J, Levy R. Immunologic phenotype in 30 patients with diffuse large-cell lymphoma. *N Eng J Med.* 1980;303:293-300.
- Zipf TF, Fox RI, Dille J, Levy R. Definition of the high-risk acute lymphoblastic leukemia patient by immunological phenotyping with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1981;41:4786-4789.
- Royston I, Majda JA, Baird SM, Meserve BL, Griffiths JC. Human T cell antigens defined by monoclonal antibodies: the 65,000-dalton antigen of T cells (T65) is also found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulin. *J Immunol.* 1980;125:725-731.
- Engleman EG, Warnke R, Fox RI, Dille J, Benike CJ, Levy R. Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:1791-1795.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
- Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry.* 1997;30:214-230.
- Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
- Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR.* 1988;37:377-388.
- Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
- Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
- Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary

- conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T-cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med.* 1981;153:310-323.
12. Ledbetter JA, Frankel AE, Herzenberg LA. Human Leu T-cell differentiation antigens: quantitative expression on normal lymphoid cells and cell lines. In: Hämmerling G, Hämmerling U, Kearney J, eds. *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas: Perspectives and Technical Notes*. New York, NY: Elsevier/North Holland; 1981:16-22.
 13. Warnke RA, Levy R. Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem.* 1980;28:771-776.
 14. Gadol N, Ault KA. Phenotypic and functional characterization of human Leu 1 (CD5) B cells. *Immunol Rev.* 1986;93:23-34.
 15. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:259-288.
 16. Haynes BF. Summary of T cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:3-30.



CD8 (SK1)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD8

Форма	№ по каталогу
FITC	345772
PE	345773
PerCP	345774
PerCP-Cy5.5	341050
PE-Cy7	335822
APC	345775
APC-Cy7	348813

5/2017

23-13696-05



© BD, 2017. BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company.



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited
14b George Bourke Drive
Mt Wellington
Auckland 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD8 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD8, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYS™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD8 в исследовании гематологической неоплазии¹

2. СОСТАВ

CD8, клон SK1, получен путем гибридизации клеток мышинной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных Т-лимфоцитами периферической крови человека. CD8 состоит из мышинных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в табл. 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC	25 мкг в 2,0 мл PBS	12,5
PE	25 мкг в 2,0 мл PBS	12,5
PerCP	12 мкг в 2,0 мл PBS	6
PerCP-Cy™5.5 ^b	5 мкг в 1,0 мл PBS	5
PE-Cy™7 ^b	25 мкг в 0,5 мл PBS	50

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
APC	25 мкг в 0,5 мл PBS	50
APC-Су7	25 мкг в 0,5 мл PBS	50

а. Конц. = концентрация

б. Су7™ — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавляется и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤ 5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP, PerCP-Су5.5, PE-Су7, APC, APC-Су7: ≤ 20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °С до истечения срока годности, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока годности. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (10X) (№ по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- BD CellWASH™ (№ по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- BD CellFIX™ (№ по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °С.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть рассмотрены до отбора образцов и анализа^{1, 2}.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток¹.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{3, 4} и при утилизации соблюдайте меры предосторожности в соответствии с законами, принятыми на федеральном, региональном и местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD8. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортксе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution.

4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортксе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты APC-Cy7 и в меньшей степени — конъюгаты PE-Cy7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида или света. Рекомендуется проводить анализ стабилизированных образцов как можно быстрее. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часового окрашивания.

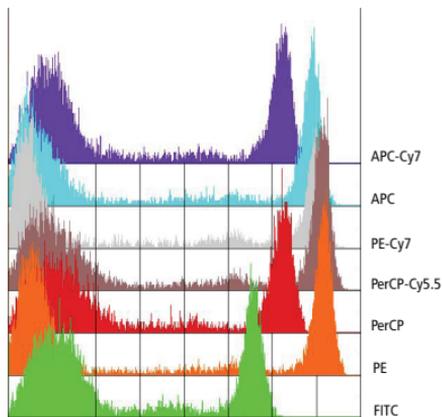
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или аберрантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр⁵. Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рис. 1 представлены репрезентативные данные, полученные на цельной крови и гейтированные по лимфоцитам. Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуется использовать гранулы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность

прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы⁶.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Антиген CD8 экспрессируется на α субъединице дисульфидсвязанного бимолекулярного комплекса молекулярной массой 32 килодальтон (кДа)^{7, 8}. Большинство CD8⁺ T-лимфоцитов периферической крови экспрессируют α/β гетеродимер (32, 30 кДа), в то время как CD8⁺CD16⁺ естественные лимфоциты-киллеры (NK) и CD8⁺ T-клеточный рецептор (TCR)- γ/δ ⁺ T-лимфоциты экспрессируют α/α гомодимер (30 кДа). CD8⁺TCR- α/β ⁺ T-лимфоциты могут экспрессировать как α/α гомодимер, так и α/β гетеродимер^{7, 8}.

Антиген CD8 присутствует на субпопуляции человеческих T-лимфоцитов, являющихся супрессорами/киллерами^{9–14}, а также на субпопуляции естественных лимфоцитов-киллеров (NK)¹⁵. Антиген CD8 экспрессируется на 19–48 % нормальных лимфоцитов периферической крови¹⁶ и 60–85 % нормальных тимоцитов^{9, 13}.

Чувствительность

Чувствительность определяется как степень разделения популяций CD8⁺ и CD8⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентра-

ция реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD8⁺ и CD8⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD8⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD8 был представлен на рассмотрении на Первой международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (First International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон SK1 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты¹⁷.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано значение средней интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в табл. 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные среднеквадратичные отклонения (SD) определяли по парным результатам для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку повторяемости в пределах образца.

Таблица 2. Повторяемость MFI CD8⁺ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№а	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	14	549,5	75,32	13,71
PE	27	3766,8	397,53	10,55

Таблица 2. Повторяемость MFI CD8⁺ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№а	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
PerCP	28	547,1	64,09	11,7
PerCP-Cy5.5	3	1034,61	157,18	15,19
PE-Cy7	3	1936,7	154,92	8,0
APC	3	1329,5	257,54	19,37
APC-Cy7	3	858,8	7,42	0,86

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем конъюгаты с другими красителями (FITC, PerCP). Если популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся подобному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитарной и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реагентов.²

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТК. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии нарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.

Проблема	Возможная причина	Решение
Густая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
2. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
3. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections Guideline—Third Edition*; Wayne, PA: National Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
4. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.

5. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
6. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
7. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
8. Terry LA, Disanto JP, Small TN, Flomenberg N. Differential expression of the CD8 and Lyt-3 antigens on a subset of human T-cell receptor α /d-bearing lymphocytes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:345-346.
9. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to the T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.
10. Engleman EG, Benike CJ, Evans RL. Circulating antigen-specific suppressor T cells in a healthy woman: mechanism of action and isolation with a monoclonal antibody. *Clin Res*. 1981;29:365A.
11. Engleman EG, Benike CJ, Glickman E, Evans RL. Antibodies to membrane structures that distinguish suppressor/cytotoxic and helper T lymphocyte subpopulations block the mixed leukocyte reaction in man. *J Exp Med*. 1981;153:193-198.
12. Kotzin BK, Benike CJ, Engleman EG. Induction of immunoglobulin secreting cells in the allogeneic mixed leukocyte reaction: regulation by helper and suppressor lymphocyte subsets in man. *J Immunol*. 1981;127:931-935.
13. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.
14. Ledbetter JA, Frankel AE, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Human Leu T-cell differentiation antigens: quantitative expression on normal lymphoid cells and cell lines. In: Hämmerling G, Hämmerling U, Kearney J, eds. *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas: Perspectives and Technical Notes*. New York, NY: Elsevier/North Holland; 1981:16-22.
15. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol*. 1983;131:1789-1796.
16. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
17. Bernard A, Bousmell L, Hill C. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories. In: Bernard A, Bousmell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:9-108.



CD14 (MФP9)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD14.

Форма	Номер по каталогу
FITC	345784
PE	345785
PerCP	345786
APC	345787
APC-Cy7	333951

5/2017

23-13699-04



© BD, 2017. BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company.



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited
14b George Bourke Drive
Mt Wellington
Auckland 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD14 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD14, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYS™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD14 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻⁷.

2. СОСТАВ

CD14, клон MФP9,^{8,9} получается из скрещенных миеломных клеток мышей Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных с помощью моноцитов человеческой периферической крови, полученной у пациента, страдающего ревматоидным артритом. CD14 состоит из мышиных тяжелых цепей Mouse IgG_{2b} и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1 Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	50 мкг в 2,0 мл PBS	25
PE	100 мкг в 2,0 мл PBS	50
PerCP	25 мкг в 1,0 мл PBS	25
APC	25 мкг в 0,5 мл PBS	50
APC-Cy™7 ^b	25 мкг в 0,5 мл PBS	50

- a. Конц. = концентрация
- b. СуTM — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в компанию BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: $\leq 5\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP, APC, APC-Cy7: $\leq 20\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока годности, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока годности. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые полистирольные пробирки 12 x 75 мм Falcon®* или аналогичные

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACSTM lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- BD CellWASHTM (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- BD CellFIXTM (номер по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{4,10}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁴.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Все биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, считаются биологически опасными. Обращайтесь с ними как с потенциальными источниками инфекции^{11,12} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD14. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальде-

гида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Эмиссионные спектры некоторых конъюгатов APC-Cy7 меняются при длительном воздействии параформальдегида. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

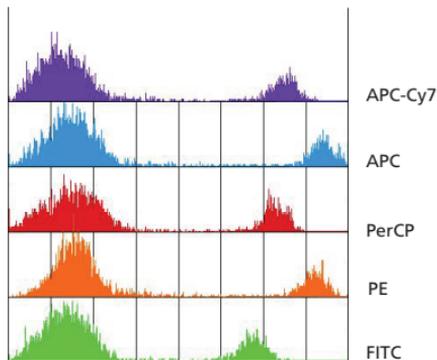
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр.¹³ Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на цельной крови и гейтированные по моноцитам. Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1. Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать гранулы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и контроля качества системы¹⁴.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Антиген CD14 присутствует в большинстве моноцитов нормальной периферической крови.¹⁵ CD14 обладает низкой способностью к реакции с гранулоцитами периферической крови.¹⁶

Реагент CD14 распознает человеческий антиген моноцитов/макрофагов с молекулярным весом 55 килодальтон (кДа)¹⁷.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD14⁺ и CD14⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD14⁺ и CD14⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD14⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD14 был представлен на рассмотрение на Первой международной научно-практической конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (First International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон МфР9 в составе слепой панели антител и сообщали согласующиеся друг с другом результаты.¹⁸

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение медианной интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по парным результатам для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для

каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI моноцитов в цельной крови по разным партиям и многим донорам (N)

	№ ^a	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	15	713,2	66,64	9,34
PE	29	2620,6	349,95	13,35
PerCP	6	416,8	99,90	23,97
APC	3	2412,2	802,53	33,27
APC-Cy7	3	1862,2	64,73	3,48

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем конъюгаты с другими красителями (FITC, PerCP). Если популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся подобному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с исполь-

зованием релевантных сочетаний реагентов¹⁰.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТК. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе, в любых применимых общих условиях продажи компании BD для клиентов за пределами США при приобретении данных изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Неадекватные параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или бледная окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством анти-тел.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспандируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hansen I, Meyer K, Hokland P. Flow cytometric identification of myeloid disorders by asynchronous expression of the CD14 and CD66 antigens. *Eur J Haematol.* 1998;61:339-346.
- Khalidi HS, Medeiros LJ, Chang KL, Brynes RK, Slovak ML, Arber DA. The immunophenotype of

adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, French-American-British classification, and karyotypic abnormalities. *Am J Clin Pathol.* 1998;109:211-220.

- Callea V, Marabito F, Oliva BM, et al. Surface CD14 positivity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is related to clinical outcome. *Br J Haematol.* 1999;107:347-352.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
- Drexler HG, Thiel E, Ludwig WD. Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1991;5:637-645.
- Drexler HG. Classification of acute myeloid leukemias: a comparison of FAB and immunophenotyping. *Leukemia.* 1987;1:697-705.
- Ziegler-Heithbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today.* 1993;14:121-125.
- Dimitriu-Bona A, Burmester GR, Waters SJ, Winchester RJ. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1983;130:145-152.
- Herrmann F, Komischke B, Odenwald E, Ludwig WD. Use of monoclonal antibodies as a diagnostic tool in human leukemia. I. Acute myeloid leukemia and acute phase of chronic myeloid leukemia. *Blut.* 1983;47:157-163.
- Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry.* 1997;30:214-230.
- Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
- Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR.* 1988;37:377-388.
- Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood

- leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
14. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry: Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
 15. Bernstein ID, Self S. Joint report of the myeloid section of the Second International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human Myeloid and Hematopoietic Cells*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;3:1-25.
 16. Jayaram Y, Hogg N. Surface expression of CD14 molecules on human neutrophils. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:796-797.
 17. Goyert SM, Ferrero E. Biochemical analysis of myeloid antigens and cDNA expression of gp55 (CD14). In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1986:613-619.
 18. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: M2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:82-108.



CD138 (MI15)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD138.

Форма	Номер по каталогу
FITC	347214
PE	347215
PerCP-Cy5.5	341107
APC	347216

5/2017

23-13745-03



© BD, 2017. BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company.



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,
14b George Bourke Drive
Mt. Wellington
Auckland 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD138 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеточек, экспрессирующих антиген CD138, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYS™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD138 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻³

2. СОСТАВ

CD138, клон MI15,¹ получен путем слияния клеток мышиной миеломы Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками человеческой линии U266. CD138 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1 Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	13 мкг в 1,0 мл PBS	13
PE	6 мкг в 1,0 мл PBS	6
PerCP-Cy™5.5 ^b	6 мкг в 1,0 мл PBS	6
APC	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25

а. Конц. = концентрация

b. Су™ — это товарный знак компании GE Healthcare. Этот продукт является предметом прав собственности GE Healthcare и Университета Carnegie Mellon, изготавливается и продается по лицензии GE Healthcare. Этот продукт лицензирован для продажи исключительно для диагностики *in vitro*. Он не лицензирован ни для каких других применений. Если вам нужна какая-либо дополнительная лицензия для использования этого продукта, верните этот продукт нераспакованным в BD Biosciences по адресу 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- FITC: $\leq 5\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP-Cy5.5, APC: $\leq 20\%$ свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока хранения, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACSTM lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга
- BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- BD CellFIX™ (номер по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACS. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{4,5}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и из-за повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁴.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Все биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, считаются биологически опасными. Обращайтесь с ними как с потенциальными источниками инфекции^{6,7} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD138. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл 1X лизирующего раствора BD FACS lysing solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.

7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

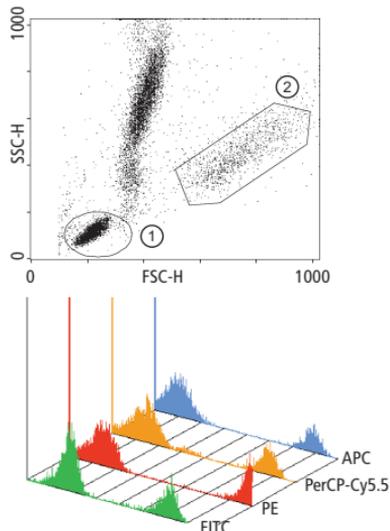
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrantного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр.⁸ Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные на периферической крови с добавлением клеток RPMI 8226 в концентрации 1 миллион клеток на мл крови и гейтированные по лимфоцитам (1) и клеткам RPMI 8226 (2). Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рисунок 1 Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуем использовать гранулы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы⁹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD138 распознает синдекан-1,^{1,3,10} представителя семейства синдеканов, трансмембранных гепаринсульфатпротеогликанов,¹⁰ основными функциями которых является регуляция лиганд-зависимой активации первичных сигнальных рецепторов на поверхности клетки.¹¹ Синдекан-1 характеризуется молекулярным полиморфизмом; его белок сердцевины представляет собой одноцепочечную молекулу размером 70–75 килодальтон (кДа), а молекулярная масса изомеров синдекана-1 варьируется приблизительно до 400 кДа.¹²

CD138 специфично идентифицирует человеческие плазматические клетки^{1,3}. Он активно реагирует с клетками всех линий множественной миеломы¹⁻³ и со злокачественными плазматическими клетками¹⁻³. Антиген CD138 присутствует на клетках Рид-Штернберга лимфомы Ходжкина классического типа (HD), как мембранных, так и плазматических,³ а также на опухолевых клетках первичной выпотной лимфомы (PEL)^{12, 13}. Антиген CD138 появляется в ходе активации и дифференциации В-клеток¹⁴ и специфичен для окончательно дифференцированных В-клеток^{1, 3}. В-CLL клетки положительны на синдекан-1¹⁴. Антиген CD138 последовательно не экспрессируется на предположительно опухолевых клетках при нодулярном подтипе лимфоидного преобладания (NLP) HD³ и не обнаруживается в В-клеточных злокачественных новообразованиях субпопуляций неходжкинской лимфомы (NHL), хронической лимфоцитарной лейкемии (CLL) и волосатоклеточного лейкоза³. Лимфома из клеток мантии отрицательна на синдекан-1¹⁴; реакция с периферической кровью, клетками костного мозга или миндалин отсутствует¹.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения CD138⁺ клеток RPMI 8226 и CD138⁻ лимфоцитов. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на смеси цельной крови и клеток RPMI 8226. Разделение CD138⁺ и CD138⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD138⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD138 был представлен на Пятой международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценили клон M15 как часть слепой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты.¹⁵

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в таблице 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные стандартные отклонения (SD) определяли по парным результатам для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого

реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2. Повторяемость MFI CD138⁺ RPMI 8226-клеток по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	6	1431,9	175,66	12,27
PE	6	6129,0	293,32	4,79
PerCP-Cy5.5	6	2206,9	115,33	5,23
APC	6	2176,7	333,56	15,32

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем конъюгаты с другими красителями (FITC, PerCP). Если популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся подобному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов⁵.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИЯ

Если не указано иначе, в любых применимых общих условиях продажи компании BD для клиентов за пределами США при приобретении данных изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии нарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.

Проблема	Возможная причина	Решение
Густая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антитела.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996;94:318-323.
2. Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood.* 1998;91:2679-2688.
3. Carbone A, Ghoghini A, Gattei V, et al. Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease react with the plasma cell-specific monoclonal antibody B-B4 and express human syndecan-1. *Blood.* 1997;89:3787-3794.
4. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.

5. Stelzel GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
6. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
7. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
8. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
9. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
10. Wijdenes J, Clément C, Klein B, Dore J-M. CD138 (syndecan-1) Workshop Panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGK, et al, eds. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Garland Publishing, Inc; 1997:249-252.
11. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*. 1997;327:1-16.
12. Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol*. 1999;104:152-162.
13. Gaidano G, Gloghini A, Gattei V, et al. Association of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus-positive primary effusion lymphoma with expression of the CD138/syndecan-1 antigen. *Blood*. 1997;90:4894-4900.
14. Sebestyén A, Berci L, Mihalik R, Paku S, Matolcsy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol*. 1999;104:412-419.
15. Horvathova M, Gaillard JP, Liautard J, et al. Identification of novel and specific antigens of human plasma cells by mAb. In: Schlossman S, Bousmell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:713-714.



CD71 (L01.1)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD71.

Форма	Номер по каталогу
FITC	333151
APC	337447

5/2017

23-13766-03



© BD, 2017. BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company.



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited
14b George Bourke Drive
Mt Wellington
Auckland 1060
New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD71 (анти-трансферриновый рецептор) предназначен для диагностической идентификации in vitro клеток, экспрессирующих антиген CD71, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYS™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD71 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻⁵

2. СОСТАВ

CD71, клон L01.1, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных бластными клетками стимулированной митогеном фитолакки периферической крови⁶. CD71 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG_{2a} и легких каппа-цепей.

Каждый реагент поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в Табл. 1.

Табл. 1 Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	200 мкг в 2,0 мл PBS	100
APC	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤ 5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- APC: ≤ 20 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом SEC

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Антитела стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока годности, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока годности. Не замораживайте реагент и не подвергайте его воздействию прямых солнечных лучей во время хранения или инкубации с клетками. Держите пузырьки с антителами в сухом месте.

Не используйте реагент в случае обнаружения каких-либо изменений в его внешнем виде. Выпадение осадка или изменение цвета означает нестабильность или непригодность.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ ИЛИ ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые полистирольные пробирки 12 x 75 мм Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACSTM Lysing Solution (10X) (№ по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.
- Центрифуга

- Раствор BD CellWASHTM (№ по каталогу 349524) или промыочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- Раствор BD CellFIXTM (№ по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточный цитометр BD FACs. Подробности см. в руководстве пользователя прибора.

5. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты можно использовать для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии различных типов образцов, включая периферическую кровь, аспираты или биопсии костного мозга и другие жидкости организма или ткани. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть рассмотрены до отбора образцов и анализа^{7, 8}.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной потери популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток⁷.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{9, 10} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

уровне. Никогда не набирайте жидкость в пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD71. Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.
2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution.
4. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
6. Добавьте 2–3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1%-го раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

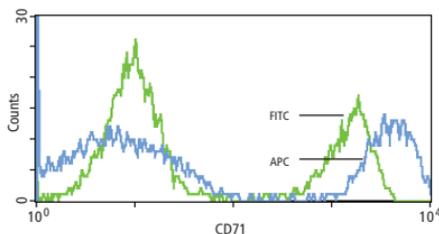
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или аберрантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр¹¹. Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На Рис. 1 представлены репрезентативные данные, полученные на клетках Раджи CD71⁺ и гейтированные по лимфоцитам, моноцитам и клеткам Раджи. Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рис. 1 Репрезентативные данные, полученные на проточном цитометре BD FACS



Внутренний контроль качества

Рекомендуется использовать гранулы BD Calibrite™ Beads и программное обеспечение BD FACSCComp™, чтобы настроить напряжение фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед его использованием. См. руководство по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads* и руководство пользователя программного обеспечения *BD FACSCComp Software User's Guide*.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы¹².

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD71 специфичен для трансферринового рецептора человека молекулярной массой 190 килодальтон (кДа), 90 кДа в восстановленном виде¹³.

Экспрессия антигена CD71 низкая на нормальных покоящихся лимфоцитах¹⁴; он экспрессируется на всех активированных клетках¹⁵. Трансферриновый рецептор необходим для транспорта ионов в пролиферирующие клетки⁶, например митоген-активированные¹⁶ и аллоантиген-активированные¹⁷ лимфобласты. Трансферриновый рецептор также присутствует на ранних эритроидных клетках, но утрачивается при дифференцировке ретикулоцитов в зрелые эритроциты¹⁸.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разделение популяции CD71⁺ и популяции CD71⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая

концентрация FITC реагента тестировалась на опухолевых клетках, а каждая концентрация APC реагента — на клетках цельной крови и клетках Раджи. Разделение CD71⁺ и CD71⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD71⁺ и соответствующих отрицательных. См. Табл. 1.

Воспроизводимость

CD71 был представлен на рассмотрение на Второй международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Second International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон L01.1 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты¹⁴.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано значение средней интенсивности флуоресценции (MFI) разных образцов, как показано в Табл. 2. Для каждого образца две разные партии реагентов дали пару результатов. Индивидуальные среднеквадратичные отклонения (SD) определяли по парным результатам для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для

каждого реагента, что обеспечивало оценку повторяемости в пределах образца.

Табл. 2 Повторяемость MFI опухолевых клеток и клеток Раджи CD71⁺ по разным партиям и многим донорам (N)

	№а	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC ^c	4	832,36	58,19	6,99
APC ^d	3	794,84	30,93	3,89

- a. N = количество образцов
 b. CV = коэффициент вариации
 c. Опухолевая клеточная линия SEM, гейтированная по живым клеткам
 d. Клетки цельной крови и клетки Раджи, гейтированные по клеткам Раджи

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем конъюгаты с другими красителями (FITC, PerCP). Если популяции перекрываются, на расчет процента клеток, положительных по маркеру, может влиять выбор флуорохрома.

Использование моноклональных антител в лечении пациентов может мешать распознаванию антигенов-мишеней данным реагентом. Это необходимо учитывать при анализе образцов пациентов, подвергающихся подобному лечению. Компания BD Biosciences пока не охарактеризовала влияние терапевтических антител на эффективность данного реагента.

Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфом. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реагентов⁸.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связке с другими маркерами в нормальных и аномальных образцах.

Данные по эффективности реагента в основном были собраны с использованием крови, обработанной ЭДТА. На эффективность реагентов может повлиять использование других антикоагулянтов.

ГАРАНТИИ

Если не указано иначе в любых принятых компанией BD общих условиях продажи для клиентов за пределами США, при приобретении этих изделий применяются следующие гарантийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержимого, заявленного на этикетке или на маркировке изделия в момент доставки его заказчику. Компания BD отказывается от всех других гарантий, явных или неявных, включая гарантии пригодности и соответствия для любой конкретной цели, а также гарантии ненарушения патентов. Исключительная ответственность компании BD ограничивается заменой изделий либо возмещением покупной цены. Компания BD не несет ответственности за материальный ущерб или любые случайные или косвенные убытки, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение клеточных обломков и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками или тромбоцитами	Приготовьте и окрасьте другой образец.
	Неправильное обращение с клеточным препаратом	Проверьте жизнеспособность клеток, центрифугируйте клетки на низких скоростях.
	Неадекватные параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.

Проблема	Возможная причина	Решение
Густая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и отрегулируйте концентрацию клеток или объем образца; выполните окрашивание свежего образца.
	Недостаточно реагента	Повторите окрашивание с увеличенным количеством антител.
	Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания	Повторите окрашивание на свежем образце; проанализируйте его немедленно.
	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспенсируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Clin Cytometry*. 2001;46:23-27.
2. McCloskey TW, Oyaizu N, Pahwa S. Review: apoptosis, HIV infection, and the Fas antigen. *Clin Immunol Newslett*. 1995;15:105-113.
3. Maynadie M, Picard F, Husson B, et al. Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2002;100:2349-2356.
4. Blair A, Hogge DE, Sutherland HJ. Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD3(+)/CD71(-)/HLA-DR-. *Blood*. 1998;92:4325-4335.
5. Knowles DM. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. In: Knowles DM, Thompson DD, eds. *Neoplastic Hematopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

6. Judd W, Poodry CA, Strominger JL. Novel surface antigens expressed on dividing cells but absent from non-dividing cells. *J Exp Med*. 1980;152:1430.
7. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
8. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
9. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
10. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
11. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
12. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
13. Newman R, Schneider C, Sutherland R, Vodineliš L, Greaves M. The transferrin receptor. *Trends Biochem Sci*. 1982;1:397.
14. Schwarzing R, Stein H. Cluster report: CD71. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:455-460.
15. Jeffries WA, Brandon MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, Mason DY. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature*. 1984;312:162-163.
16. Larrick JW, Cresswell P. Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cell density and state of activation. *J Supramol Struct*. 1979;11:579-586.

17. Phillips JH, Le AM, Lanier LL. Natural killer cells activated in a human mixed lymphocyte response culture identified by expression of Leu-11 and class II histocompatibility antigens. *J Exp Med.* 1984;159:993-1008.
18. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. I. Normal erythroid development. *Blood.* 1987;69:255-263.