



CD16 (B73.1)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD16.

Форма	Номер по каталогу
PE	332779
PE-Cy7	335823

12/2013

23-13720-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



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

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

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект 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 необходимым аналитическим ПО (таким как ПО BD CellQuest™ или BD LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

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

2. СОСТАВ

CD16, клон B73.1,³⁻⁵ получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных естественными клетками-киллерами.

CD16 (B73.1) 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)
PE	50 мкг в 2,0 мл PBS	25
PE-Cy7™ ^{7b}	50 мкг в 0,5 мл PBS	100

а. Конц. = концентрация

- b. Cy™ — 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, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

Чистота антител следующая:

- PE, PE-Cy7: ≤ 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 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»

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- Лизирующий раствор BD FACS 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^{6,7}.

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 клеток⁶.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Все биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, считаются биологически опа-

сними. Обращайтесь с ними 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.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD16. 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.
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.

ВНИМАНИЕ! Эмиссионные спектры некоторых конъюгатов PE-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.

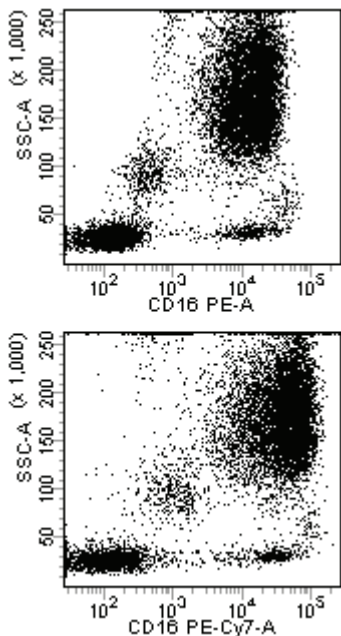
Аналитические результаты

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.¹⁰ 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 лизированной 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

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 системы¹¹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Антитела CD16 распознают антиген размером от 50 до 65 килодальтон (кДа), присутствующий на человеческих естественных клетках-киллерах, который является рецептором типа III фрагмента Fc IgG.¹²

Антиген CD16 экспрессируется приблизительно на 15 % лимфоцитов периферической крови и присутствует практически на всех остальных покоящихся естественных клетках-киллерах.¹² У некоторых лиц антиген CD16 может экспрессироваться на CD3⁺ T-лимфоцитах.¹³ Антиген CD16 также экспрессируется на нейтрофилах.¹⁴ CD16 (B73.1) реагирует с нейтрофилами слабее, чем CD16 (NKP15) и CD16 (GO22).^{4,15} Переменное количество лимфоцитов CD16⁺ коэкспрессируют антиген CD57, антиген CD8 низкой плотности или оба.^{4,14,15} Естественные клетки-киллеры CD16⁺CD56⁺ характеризуются обратным переносом состояния активации с дендритными клетками.¹⁶

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 (B73.1) был представлен на Четвертой международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценили клон B73.1 (известный как Leu-11c) как часть слепой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты.¹⁷

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 CD16⁺ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№a	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CVb
PE	5	374,65	73,7	19,67
PE-Cy7	7	397,9	16,54	4,16

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 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 применимых общих условиях продажи компании BD для клиентов за пределами США при приобретении данных изданий применяются следующие гаран-

тийные обязательства.

В соответствии с настоящим документом гарантийные обязательства распространяются на проданные изделия только с целью подтверждения количества и содержания, 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 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

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. Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol.* 1983;130:2142-2148.
4. 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.
5. Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
6. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
7. 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.
8. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
9. 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. 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.
 11. *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.
 12. 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.
 13. 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;162:2089-2106.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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; 1989:574-578.



CD61 (RUU-PL 7F12)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD61.

Форма	Номер по каталогу
FITC	347407
PerCP	347408

2/2014

23-13765-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



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

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

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD61 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD61, 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 CD61 в исследовании гематологической неоплазии^{1, 2}.

2. СОСТАВ

CD61, клон RUU-PL 7F12³, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных очищенными гликопротеинами мембраны тромбоцитов. CD61 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 Табл. 1.

Табл. 1 Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
FITC	25 мкг в 2,0 мл PBS	12,5
PerCP	3 мкг в 1,0 мл PBS	3

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤ 5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PerCP: ≤ 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 FACST[™] 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 °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 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. 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.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD61. 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. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

Аналитические результаты

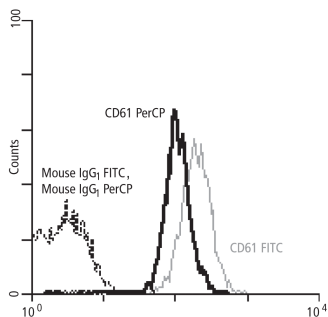
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведе-

ния 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 цитометр⁸. 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 фиксированных тромбоцитах и гейтированные по тромбоцитам. Лазерное возбуждение при длине волны 488 нм.

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



Внутренний контроль качества

Рекомендуется использовать гранулы BD Calibrite™ Beads и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресцен-

ции, 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

CD61 распознает белок молекулярной массой 110 килодальтон (кДа), известный также как gpIIb, распространенную β3-субъединицу (β3-цепь интегрина) комплекса gpIIb/IIIa и рецептор витронектина (VNR)^{10–12}.

Комплекс gpIIb/IIIa и VNR — это интегрины, α/β-гетеродимерные гликопротеиновые комплексы, участвующие в клеточной адгезии^{12–16}. С антигеном CD41 (gpIIb или α_{IIb}) антиген CD61 образует комплекс gpIIb/IIIa, который действует в качестве рецептора фибриногена, фактора фон Виллебранда (vWF), фибронектина и витронектина на активированных тромбоцитах^{11, 12, 15, 17–19}. С антигеном CD51 (VNR α-цепь или α_v) антиген CD61 образует VNR, опосредующий активационно независимую клеточную адгезию к витронектину, vWF, фибриногену и тромбоспондину^{12, 17}.

Антиген CD61 присутствует на всех нормальных покоящихся и активированных тромбоцитах¹¹. Тромбоциты больных тромбастенией Гланцманна демонстрируют более чем 90 % снижение связывания CD61, а гетерозиготные носители данного заболевания демонстрируют прибли-

зительно 50 % снижение^{20, 21}. Антиген CD61 также присутствует на клетках эндотелия, мегакариocyтах и некоторых миелоидных, эритроидных и Т-лимфоидных лейкоэмических клеточных линиях^{11, 15, 17}.

Чувствительность

Чувствительность определяется как степень разделения популяций CD61⁺ и CD61⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на тромбоцитах цельной крови. Разделение CD61⁺ и CD61⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD61⁺ и соответствующих отрицательных. См. Табл. 1.

Воспроизводимость

CD61 был представлен на рассмотрении на Пятой международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон RUU-PL 7F12 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты³.

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 тромбоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	3	114,46	13,44	12,06
PerCP	4	112,63	21,25	18,87

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, подвергаю-

щихся 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 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.
	Ненадлежащие параметры настройки	Следуйте процедурам настройки прибора; оптимизируйте настройки, если необходимо.
Тусклая или блеклая окраска	Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания	Проверьте и регулируйте 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. Erber WN, Breton-Gorius J, Villeval JL, Oscier DG, Bai Y, Mason DY. Detection of cells of magakaryocyte lineage in haematological malignancies by immuno-alkaline phosphatase labelling cell smears with a panel of monoclonal antibodies. *Br J Haematol*. 1987;65:87-94.

2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9(10):1783-1786.
3. Wong DA, Springer TA. CD61 (B3) cluster report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:1664-1665.
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. von dem Borne AEGKr, Admiraal LG, Daams M, Hogervorst F, Modderman PW. Immunocytological evaluation of the mAb of the platelet panel. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:967-969.
11. Modderman PW. Cluster report: CD61. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1025.

12. Modderman PW. New clusters: CD29/CDw49, CD4, CD51, CD55, and CD61. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1017-1019.
13. Springer T. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346:425-434.
14. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11-25.
15. Fitzgerald LA, Steiner B, Rall Jr SC, Lo S-S, Phillips DR. Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. *J Biol Chem*. 1987;262:3936-3939.
16. Parmentier S, Kaplan C, Catimel B, McGregor J. New families of adhesion molecules play a vital role in platelet functions. *Immunol Today*. 1990;11:225-227.
17. von dem Borne AEGKr, Modderman PW, Admiraal LG, Nieuwenhuis HK. Platelet antibodies, the overall results. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:951-977.
18. Fijnheer R, Modderman PW, Veldman H, et al. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. *Transfusion*. 1990;30:20-25.
19. von dem Borne AEGKr, Modderman PW. Cluster report: CD41. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:997-999.
20. Jennings LK, Ashmun RA, Wang WC, Dockter ME. Analysis of human platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. *Blood*. 1986;68:173-179.
21. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb•IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*. 1985;260:11107-11114.



CD117 (104D2)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD117.

Форма	Номер по каталогу
PE	332785
PerCP-Cy5.5	333950
PE-Cy7	339217
APC	333233

11/2013

23-13706-03



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



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

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

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
 ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD117 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD117, 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 LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD117 в исследовании гематологической неоплазии^{1,2}

2. СОСТАВ

CD117, клон 104D2, получен путем слияния клеток мышиной миеломы Sp2/0 со спленоцитами мышей BALB/c, иммунизированных мегакариоцитарной клеточной линией MOLM-1.^{3, 4} CD117 состоит из мышиных тяжелых цепей Mouse 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)
PE	10 мкг в 1,0 мл PBS	10
PerCP-Cy TM 5.5 ^b	1 мкг в 1,0 мл PBS	1
PE-Cy TM 7	6,25 мкг в 0,5 мл PBS	12,5
APC	5 мкг в 0,5 мл PBS	10

а. Конц. = концентрация

б. CyTM — 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 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:

- PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC: ≤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 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) (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

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

должны быть рассмотрены до отбора образцов и анализа.^{5,6}

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 клеток⁵.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Все биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, считаются биологически опасными. Обращайтесь с ними 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 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD117.

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 инкуби-

руйте 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.

ВНИМАНИЕ! Эмиссионные спектры некоторых конъюгатов PE-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

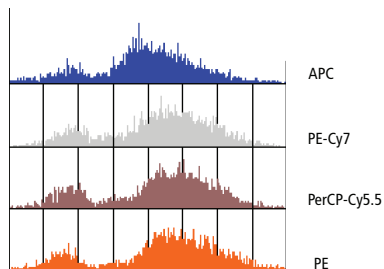
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или аберрантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр.⁹ 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 клетках эритролейкоза человека (HEL) и гейтированные по клеткам HEL и гранулоцитам. 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 системы¹⁰.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD117 связывается с рецептором фактора стволовых клеток (SCF).¹¹⁻¹⁹ Он селективно узнает клетки NIH-3T3, трансфицированные c-kit человека — геном, кодирующим SCF-R. Антитела CD117 не блокируют эпитоп, связывающий SCF.¹⁹

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD117⁺ и CD117⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента PE тестировалась на костном мозге. Каждая концентрация реагентов PerCP-Cy5.5 и APC тестировалась на цельной крови с клетками HEL. Разделение CD117⁺ и CD117⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD117⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD117 был представлен на рассмотрении на Шестом международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон 104D2 в составе слепой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты⁴.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окраши-

вали 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 костного мозга или клеток HEL по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
PE ^c	4	207,63	65,66	31,62
PerCP-Cy5.5 ^d	6	617,58	63,59	10,30
PE-Cy7 ^d	6	3881,8	314,94	8,11
APC ^c	6	598,17	51,61	8,63

- a. N = количество образцов
- b. CV = коэффициент вариации
- c. костный мозг
- d. клетки HEL добавлены к цельной крови

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 реагентов.⁶

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 содержания, 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 аزيد натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте аزيد 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

- Newell JO, Cessna MH, Greenwood J, Hartung L, Bahler DW. Importance of CD117 in the evaluation of acute leukemias by flow cytometry. *Cytometry*. 2003;52B:40-43.
- Rizzatti EG, Garcia AB, Portieres FL, Silva DE, Martins SL, Falcao RP. Expression of CD117 and

CD11b in bone marrow can differentiate acute promyelocytic leukemia from recovering benign myeloid proliferation. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:31-37.

- Matsuo Y, Adachi T, Tsubota T, Imanishi J, Minowada J. Establishment and characterization of a novel megakaryoblastoid cell line, MOLM-1, from a patient with chronic myelogenous leukemia. *Human Cell*. 1991;4:261-264.
- Ashman LK, Cambareri AC, Nguyen L, Bühring H-J. CD117 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, et al, eds. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Garland Publishing, Inc; 1997:816-818.
- 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.
- Berardi AC, Wang A, Levine JD, Lopez P, Scadden DT. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science*. 1995;267:104-108.
- Gunji Y, Nakamura M, Osawa H, et al. Human primitive hematopoietic progenitor cells are more

- enriched in KIT^{low} cells than in KIT^{high} cells. *Blood*. 1993;82:3283-3289.
13. Broudy VC, Lin N, Zsebo KM, et al. Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood*. 1992;79:338-346.
 14. Briddell RA, Broudy VC, Bruno E, Brandt JE, Srour EF, Hoffman R. Further phenotypic characterization and isolation of human hematopoietic progenitor cells using a monoclonal antibody to the c-kit receptor. *Blood*. 1992;79:3159-3167.
 15. Simmons PJ, Aylett GN, Niutta S, Bik To L, Juttner C, Ashman L. c-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture. *Exp Hematol*. 1994;22:157-165.
 16. Olweus J, Terstappen LWMM, Thompson PA, Lund-Johansen F. Expression and function of receptors for stem cell factor and erythropoietin during lineage commitment of human hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996;88:1594-1607.
 17. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, et al. Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood*. 1991;78:1706-1712.
 18. Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:1502-1506.
 19. Yarden Y, Kuang W-J, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987;6:3341-3351.



CD11c (S-HCL-3)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD11c

Форма	Номер по каталогу
PE	333149
APC	333144

10/2013

23-13719-04



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



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

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

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD11c предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD11c, 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 LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD11c в исследовании гематологической неоплазии¹⁻⁴

2. СОСТАВ

CD11c, клон S-HCL-3, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей CD-1, иммунизированных цельными клетками и мембранными препаратами клеток волосатоклеточного лейкоза. CD11c состоит из тяжелых цепей иммуноглобулина мыши 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)
PE	25 мкг в 2,0 мл PBS	12,5
APC	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- PE, APC: ≤ 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 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
- BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- 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 рассмотрены до отбора образцов и анализа.^{5,6}

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 клеток⁵.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Все биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, считаются биологически опасными. Обращайтесь с ними 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 пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD11c. 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

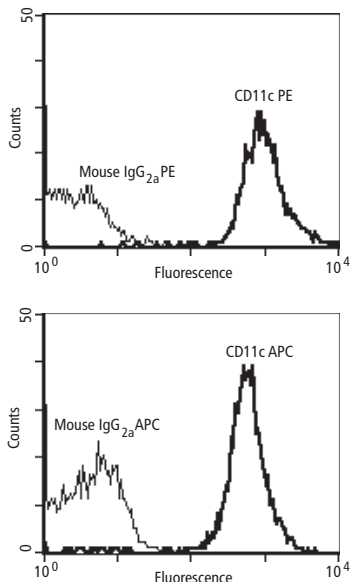
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного

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.⁹ 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, лимфоцитам и гранулоцитам. 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 системы¹⁰.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD11c распознает антиген моноцитов/макрофагов человека. CD11c специфичен для 150 килодальтон (кДа)¹¹ α -субъединицы гетеродимера антигена CD11c/CD18, называемого также рецептором компонента 4 типа (CR₄)¹². 95-кДа антиген CD18, β цепь функционально-связанного антигена лимфоцитов — 1 (LFA-1), является общей для гетеродимеров антигенов CD11a/CD18 (LFA-1) и CD11b/CD18^{13–15}.

Антиген CD11c присутствует на моноцитах и, с низкой плотностью, на гранулоцитах и естественных клетках-киллерах периферической крови¹². Он также присутствует на клетках волосатоклеточного лейкоза и некоторых клетках острого миелоидной лейкемии (AML)¹¹. CD11c реагирует с эпитопом на 150-кДа цепи антигенного комплекса CD11c/CD18. Кроме того, CD11c окрашивает синусовые гистиоциты лимфатических узлов, миндалин и селезенки; макрофаги коркового и мозгового вещества вилочковой железы; клетки Купфера печени; продолговатые межтубулярные клетки почек и альвеолярные макрофаги легочной ткани.¹¹ В злокачественных тканях данные антитела окрашивают клетки истинных гистиоцитарных лимфом и не окрашивают карциномы или Т- или В-лимфомы.^{11,12}

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD11c⁺ и CD11c⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD11c⁺ и CD11c⁻ определяли для каждого образца и

усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD11c⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD11c 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 оценили клон S-HCL-3 в составе слепой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом 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 парным результатам для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

Таблица 2 Повторяемость MFI CD11c⁺ лейкоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
PE ^c	4	332,23	19,43	5,85
PE ^d	4	90,29	7,76	8,6
APC ^e	7	94,93	5,59	5,89

- a. N = количество образцов
- b. CV = коэффициент вариации
- c. Целая кровь, гейтированная по моноцитам
- d. Целая кровь, гейтированная по лимфоцитам
- e. Целая кровь, гейтированная по гранулоцитам и моноцитам

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, подвергшихся 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 реагентов.⁶

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 ненарушения патентов. Искключительная 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
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 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

- 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.
- Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry*. 2001;46:23-27.
- 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.
- Nicolaou F, Teodoridis JM, Park H, et al. CD11c gene expression in hairy cell leukemia is dependant upon activation of the proto-oncogenes ras and junD. *Blood*. 2003;101:4033-4041.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of

- hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
6. 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.
7. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
8. 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.
9. 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.
10. *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.
11. Schwarting R, Stein H, Wang CY. The monoclonal antibodies alpha S-HCL 1 (alpha Leu-14) and alpha S-HCL 3 (alpha Leu-M5) allow the diagnosis of hairy cell leukemia. *Blood*. 1985;65:974-983.
12. Myones BL, Dalzell JG, Hogg N, Ross GD. Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J Clin Invest*. 1988;82:640-651.
13. Lanier LL, Arnaout MA, Schwarting R, Warner NL, Ross GD. p150/95, third member of the LFA-1/CR3 polypeptide family identified by anti-Leu M5 monoclonal antibody. *Eur J Immunol*. 1985;15:713-718.
14. Kürzinger K, Ho MK, Springer TA. Structural homology of a macrophage differentiation antigen and an antigen involved in T-cell-mediated killing. *Nature*. 1982;296:668-670.
15. Sanchez-Madrid F, Simon P, Thompson S, Springer TA. Mapping of antigenic and functional epitopes on the alpha- and beta-subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and Mac-1. *J Exp Med*. 1983;158:586-602.
16. 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.



CD22 (S-HCL-1)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD22

Форма	Номер по каталогу
FITC	337898
PE	337899
APC	333145

2/2014

23-13701-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



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

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

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD22 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD22, 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 LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD22 в исследовании гематологической неоплазии^{1,2}

2. СОСТАВ

CD22, клон S-HCL-1³, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей CD-1, иммунизированных цельными клетками и мембранными препаратами клеток волосато-клеточного лейкоза. CD22 состоит из тяжелых цепей иммуноглобулина мыши IgG_{2b} и легких каппа-цепей.

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

Таблица 1. Концентрации во флаконах

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

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

bdbiosciences.com
 ClinicalApplications@bd.com

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

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACST[™] lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разбавлению и 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 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. 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

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

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 CD22. 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.

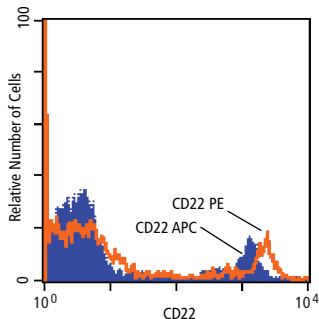
Аналитические результаты

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 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 периферической 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

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 здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы⁹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Реагент CD22 распознает антиген В-лимфоцитов человека с молекулярным весом 135 килодальтон (кДа)¹⁰.

Антиген CD22 экспрессируется в цитоплазме всех В-лимфоцитов и присутствует только на клеточной поверхности зрелых В-лимфоцитов¹¹. В отличие от антигенов CD10, CD19 и CD20, антиген CD22 еще присутствует на лимфоплазматических клетках, но убывает на полностью созревших плазматитах¹². Антиген CD22 экспрессируется при большинстве В-клеточных лейкозов, в том числе лейкозе ворсистых клеток³, и почти всех (97 %) В-клеточных лимфомах¹³, но не при Т-клеточных лейкозах или Т-клеточных лимфомах¹⁴. Плотность антигена значительно повышена при волосато-клеточных лейкозах^{3,10}.

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций CD22⁺ и CD22⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD22⁺ и CD22⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD22⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD22 был представлен на рассмотрение на Втором международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Second International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон S-HCL-1 в составе слепой панели антител и сообщили согласующиеся результаты¹⁰.

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 CD22⁺ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	4	61,18	4,88	7,98
PE	4	598,15	74,99	12,54
APC	5	571,12	46,18	8,09

- 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 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 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 тромбocyтами	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
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 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	Ресуспенсируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- 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; 2001:93-226.
- Schwartz R, Stein H, Wang CY. The monoclonal antibodies α S-HCL-1 (α Leu-14) and α S-HCL-3 (α Leu-M5) allow the diagnosis of hairy cell leukemia. *Blood*. 1985;65:974-983.
- 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.
- Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:3-43.
- Loken MR, Shah V, Hollander Z, Civin C. Flow cytometric analysis of normal B lymphoid development. *Pathol Immunopathol Res*. 1988;7:357-370.
- Terstappen LWMM, Johnsen S, Segers-Nolten IMJ, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high resolution flow cytometry. *Blood*. 1990;76:1739-1747.
- Borowitz M, Bousvaros A, Brynes R, et al. Monoclonal antibody phenotyping of B cell non-Hodgkins lymphoma: The Southeastern Cancer Study Group experience. *Am J Pathol*. 1985;121:514-521.
- Mason DY, Stein H, Gerdes J, et al. Value of monoclonal anti-CD22 (p135) antibodies for the detection of normal and neoplastic B lymphoid cells. *Blood*. 1987;69:836-840.



CD45RA (L48)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD45RA.

Форма	№ по каталогу
FITC	335039
PE-Cy7	337186

3/2014

23-13764-03



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



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

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

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD45RA предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD45RA, 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 LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD45RA в исследовании гематологической неоплазии¹⁻³

2. СОСТАВ

CD45RA, клон L48, получается путем гибридизации клеток Sp2/0 мышиной миеломы с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных человеческими лимфоцитами с низкой плавучестью. CD45RA 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.

Табл. 1 Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC	100 мкг в 2,0 мл PBS	50
PE-Cy7™ ^b	25 мкг в 0,5 мл PBS	50

- a. Конц. = концентрация
b. Cy™ — 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, 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-Cy7: ≤ 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 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 FACST[™] Lysing Solution (10X) (№ по каталогу 349202). Инструкции по разведению и меры предосторожности см. в инструкции по эксплуатации.
- Центрифуга

- Раствор BD CellWASH[™] (№ по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
 - Раствор 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 °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 анализа⁴.

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 полистирольной пробирке 12 x 75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD45RA. 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 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%-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! Эмиссионные спектры некоторых конъюгатов PE-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.

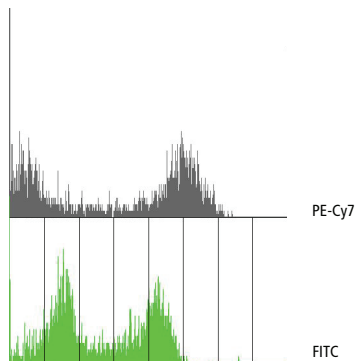
Аналитические результаты

При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или 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 цитометр⁸. 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 моноклеарных клетках периферической крови (PBMC) и синхронизированные по лимфоцитам. Лазерное возбуждение проводилось при длине волны 488 нм.

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



Внутренний контроль качества

Рекомендуем 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 *Руководство пользователя программного обеспечения BD FACSComp*.

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

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD45RA распознает изоформу антигена лейкоцитов человека (LCA) с молекулярной массой 220 килодальтон (кДа)¹⁰. Антиген CD45RA — член семейства антигенов CD45, которое также включает антигены CD45, CD45RB и CD45RO¹⁰.

Антиген CD45RA присутствует приблизительно на 50 % CD4⁺ Т-лимфоцитов, приблизительно на 75 % CD8⁺ Т-лимфоцитов и практически на всех В-лимфоцитах и естественных лимфоцитах-киллерах (NK)¹¹. Субпопуляция Т-лимфоцитов супрессоров/индукторов также экспрессирует фенотип CD4⁺CD45RA⁺¹¹. Антиген CD45RA экспрессируется на «необученных» Т-лимфоцитах; плотность антигена возрастает после активации *in vitro*¹². Промонстрирована селективная потеря субпопуляции CD4⁺CD45RA⁺ при активном рассеянном склерозе^{13, 14}.

Чувствительность

Чувствительность определяется как степень разделения популяций CD45RA⁺ и CD45RA⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD45RA⁺ и CD45RA⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD45RA⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано значение средней интенсивности флуорес-

ценции (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 внутри выборки.

Табл. 2 Повторяемость MFI CD45RA⁺ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	8	148,59	16,89	11,37
PE-Cy7	4	2963,3	119,79	4,04

a. N = количество образцов

b. CV = 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 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 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 этими изделиями.

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 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 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

- Isoda A, Yokohama A, Matsushima R, Tsukamoto N, Nojima Y, Karasa M. The naive T-lymphocyte compartment is well preserved in patients with chronic myelogenous leukaemia in chronic phase. *Br J Haematol.* 2002;119:949-955.
- Mackus WJM, Frakking FN, Grummels A, et al. Expansion of CMV-specific CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2003;102:1057-1063.
- Trimoreau F, Donnard M, Turlure P, Gachard N, Bordessoule D, Feuillard J. The CD4⁺ CD56⁺ CD116⁺ CD123⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ profile specific of DC2 malignancies. *Haematologica.* 2003;88:ELT10.
- 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.
- Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
- Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR, Schlossman SE. The isolation and characterization of the human suppressor/inducer T-cell subset. *J Immunol.* 1985;134:1508-1515.

12. Serra HM, Krowka JF, Ledbetter JA, Pilarski LM.
Loss of CD45R (Lp220) represents a post-thymic T-cell differentiation event. *J Immunol.* 1988;140:1435-1441.
13. Rose LM, Ginsburg AH, Rothstein TL, Ledbetter JA, Clark EA. Selective loss of a subset of T helper cells in active multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:7389-7393.
14. Sobel R, Hafler D, Castro E, Morimoto C, Weiner H. The 2H4 (CD45R) antigen is selectively decreased in multiple sclerosis lesions. *J Immunol.* 1988;140:2210-2214.



CD11b (D12)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD11b

Форма	Номер по каталогу
PE	333142
APC	333143

2/2014

23-13718-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



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

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

Becton Dickinson Limited,
 8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
 Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект CD11b предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD11b, 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 LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена CD11b в исследовании гематологической неоплазии¹⁻¹⁰

2. СОСТАВ

CD11b, клон D12¹¹, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных Т-лимфоцитами периферической крови. CD11b состоит из тяжелых цепей иммуноглобулина мыши IgG_{2b} и легких каппа-цепей.

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

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
PE	100 мкг в 2,0 мл PBS	50
APC	25 мкг в 0,5 мл PBS	50

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- PE, APC: ≤ 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 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 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 ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые 12 x 75-мм полистирольные пробирки с крышками Falcon®* или аналогичные
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACST[™] lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202). Инструкции по разбавлению и 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^{12,13}.

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 клеток¹².

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{14,15} и при утилизации соблюдайте меры безопасности, соответствующие законам, принятым на федеральном, региональном или местном уровне. Никогда не набирайте жидкость в

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

пипетку ртом. Следует использовать соответствующую защитную одежду, средства защиты глаз и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

ВНИМАНИЕ! Связывание данного антигена CD11b зависит от присутствия Ca^{++} . Использование ЭДТА или ACD в качестве антикоагулянта может повлиять на связывание. Рекомендуется использование гепарина в качестве антикоагулянта или удаление антикоагулянта^{6,7}.

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD11b. 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.

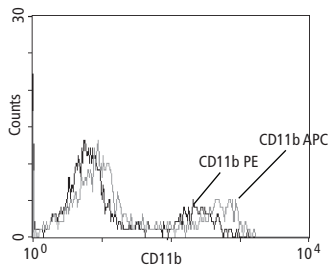
Аналитические результаты

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 цитометре¹⁶. 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 периферической крови и гейтированные по лимфоцитам и гранулоцитам. 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 здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы¹⁷.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Реагент CD11b распознает антиген лейкоцитов человека, который является рецептором компонента C3bi (CR₃)¹. CD11b специфичен для 165-килодальтон (кДа) α субъединицы гетеродимера антигена CD11b/CD18². 95-кДа антиген CD18, β цепь лейкоцитарного функционально-свя-

занного антигена-1 (LFA-1β), является общим для гетеродимеров антигенов CD11a/CD18 (LFA-1) и CD11c/CD18².

Антиген CD11b присутствует на приблизительно 30 % лимфоцитов периферической крови, включая большинство естественных киллеров (NK) и подмножество Т-лимфоцитов³. Он также присутствует на зрелых нейтрофилах и моноцитах⁴. CD11b⁺ лимфоциты составляют от 5 % до 50 % CD8⁺. Эти CD8⁺CD11b⁺ лимфоциты связаны с супрессией, определяемой их влиянием на пролиферативный ответ CD4⁺ лимфоцитов на столбнячный анатоксин⁴.

Чувствительность

Чувствительность определяется как степень разделения популяций CD11b⁺ и CD11b⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD11b⁺ и CD11b⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD11b⁺ от соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD11b был представлен на рассмотрение на Втором международном семинаре-конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Second International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон D12 в составе слепой панели антител и сообщили согласующиеся результаты⁵.

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окраши-

вали 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 CD11b⁺ лейкоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	N ^a	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
PE	4	55,03	6,13	11,14
APC	4	592,81	3,85	0,65

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 лейкоemий и лимфом. Использование соче-

таний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов¹³.

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.
	Ненадлежащие 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.
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

- Ross GD, Cain JA, Lachmann PJ. Membrane complement receptor type three (CR₃) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin and functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC₃b. *J Immunol.* 1985;134:3307-3315.
- Patarroyo M, Makgoba MW. Leukocyte adhesion to cells: molecular basis, physiological relevance, and abnormalities. *Scand J Immunol.* 1989;30:129-164.
- Lanier LL, Phillips JH. A map of the cell surface antigens expressed on resting and activated human

natural killer cells. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human Myeloid and Hematopoietic Cells*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;3:157-170.

- Landay A, Gartland L, Clement LT. Characterization of a phenotypically distinct subpopulation of Leu-2⁺ cells that suppresses T cell proliferative responses. *J Immunol.* 1983;131:2757-2761.
- 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.
- Shalekoff S, Page-Shipp L, Tiemessen CT. Effects of anticoagulants and temperature on expression of activation markers CD11b and HLA-DR on human leukocytes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5:695-702.
- Repo H, Jansson S-E, Leirisalo-Repo M. Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *J Immunol.* 1995;155:65-79.
- 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; 2001:93-226.
- Rizzatti EG, Garcia AB, Portieres FL, Silva DE, Martins SL, Falcao RP. Expression of CD117 and CD11b in bone marrow can differentiate acute promyelocytic leukemia from recovering benign myeloid proliferation. *Am J Clin Pathol.* 2002;118:31-37.
- Amirghofran Z, Zakerinia M, Shamseddin A. Significant association between expression of the CD11b surface molecule and favorable outcome for patients with acute myeloblastic leukemia. *Int J Hematol.* 2001;73:502-506.
- Zola H. CD10 Workshop Panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leukocyte 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.

15. 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.
16. 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.
17. *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.



Anti-TCR- α/β (WT31)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген TCR- α/β

Форма **Номер по каталогу**
FITC **333140**

11/2013

23-13761-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



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

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

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект Anti-TCR- α/β предназначен для диагностической идентификации in vitro клеток, экспрессирующих антиген TCR- α/β , 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 CellQuestTM или BD LYSYSTM II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия антигена TCR- α/β в исследовании гематологической неоплазии^{1,2}

2. СОСТАВ

Anti-TCR- α/β , клон WT31, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы Sp2/0-Ag14 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных тимоцитами человека.³ Anti-TCR- α/β состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.³

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	100 мкг в 2,0 мл PBS	50

а. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤ 5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (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
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- CD3 PE (номер по каталогу 347347)
- 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. Хра-

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

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 10^6 клеток мононуклеаров периферической крови человека (РВМС) в 50 мкл среды, содержащей 0,1 % азида натрия, в пробирке 12 x 75 мм добавьте 20 мкл реагента.
2. Тщательно перемешайте и выдержите в течение 15 минут в темном месте при температуре 2–8 °C.
3. Добавьте 20 мкл CD3 PE.
4. Тщательно перемешайте и выдержите повторно в течение 15 минут в темном месте при температуре 2–8 °C.
5. Промойте раствором BD CellWASH (или промывочным буфером).
6. 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! Anti-TCR- α/β частично ингибируется связыванием антител с антигеном CD3.⁸ Anti-TCR- α/β FITC и Anti-CD3, клон SK7, PE проверены при поставляемых концентрациях и рекомендованы для двухцветных иммунофлуоресцентных исследований. При использовании других антител, направленных против антигена CD3, совместно с Anti-TCR- α/β возможны проблемы. Обратное сочетание, Anti-CD3 FITC и Anti-TCR- α/β Biotin с реагентом второго этапа, также не рекомендуется ввиду стерического несоответствия. Поскольку антиген TCR-1 лабилен в препаратах срезов тканей, эффективность Anti-TCR- α/β при иммуногистологических применениях неоптимальна.

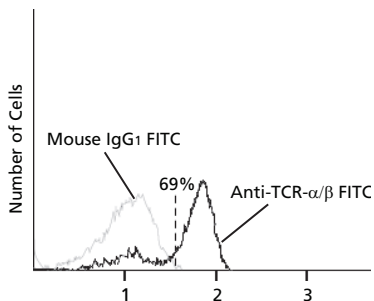
Аналитические результаты

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 цитометр.⁹ 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 обычной крови и гейтированные по лимфоцитам. Лазерное возбуждение при длине волны 488 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 здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек прибора и для контроля качества системы¹⁰.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

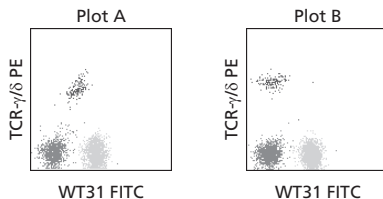
Специфичность

Anti-TCR- α/β распознает конформационный эпитоп, образованный Т-клеточным рецептором (TCR) антигена и эпислон-цепью CD3.^{8,11} α/β TCR — это дисульфидсвязанный гетеродимер массой 80 килодальтон (кДа), состоящий из α -цепи массой 44 кДа и β -цепи массой 37 кДа.^{8,12}

WT31 (Anti-TCR- α/β) идентифицирует приблизительно 97 % Т-лимфоцитов обычной периферической крови, экспрессирующих антиген CD3.¹³ Антиген TCR- α/β также экспрессируется на 50–70 % тимоцитов.¹³ Небольшая субпопуляция Т-лимфоцитов обычной периферической крови (1–9 %) и тимоцитов (менее 2 %) не реагирует с Anti-TCR- α/β или реагирует слабо.^{3,13,14} Данная CD3⁺ TCR- α/β -субпопуляция экспрессирует в основном γ/δ цепи комплекса TCR.^{3,13,14}

ПРИМЕЧАНИЕ Упомянутая слабая реактивность объясняется тем, что WT31 распознает конформационный эпитоп, возникающий при ассоциации γ или δ субъединиц с ϵ цепью CD3.¹¹ На рисунке 2 (графики А и В) показано влияние отсутствия и присутствия CD3 на паттерны окрашивания WT31 и TCR- γ/δ . При использовании трансфицированного ϵ -CD3 (или другой системы) антитела WT31 могут не обнаруживать присутствия субъединиц α/β . Anti-TCR- α/β вызывает митоз покоящихся Т-лимфоцитов периферической крови у чувствительных пациентов.¹⁵⁻¹⁷

Рисунок 2 Двухпараметрический анализ лизированной цельной крови, окрашенной WT31 (Anti-TCR- α/β -1) FITC и TCR- γ/δ PE



Чувствительность

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

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окраши-

вали 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 Anti-TCR- α/β^+ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	7	97,06	6,34	6,53

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 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 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 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

- Spits H, Paliard X, Vandekerckhove Y, van Vlasselaer P, de Vries JE. Functional and phenotypic differences between CD4⁺ and CD4⁺ T cell receptor-gamma delta clones from peripheral blood. *J Immunol.* 1991;147:1180-1188.
- 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; 2001:93-226.
- Weiss A, Newton M, Crommie D. Expression of T3 in association with a molecule distinct from the T cell antigen receptor heterodimer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:6998-7002.
- 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.
- Spits H, Borst J, Tax W, Capel P, Terhorst C, de Vries J. Characteristics of a monoclonal antibody (WT31) that recognizes a common epitope on the human T cell receptor for antigen. *J Immunol.* 1985;135:1922-1928.
- 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.
- Salmerón A, Sanchez-Madrid F, Ursá M, Fresno M, Alarcón B. A conformational epitope expressed upon association of CD3ε with either CD3-δ or CD3-γ is the main target for recognition by Anti-CD3 monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1991;147:3047-3052.
- Oettgen H, Kappler J, Tax W, Terhorst C. Characterization of the two heavy chains of the T3

- complex on the surface of human T lymphocytes. *J Biol Chem.* 1984;259:12039-12048.
13. Lanier LL, Weiss A. Presence of Ti (WT31) negative T lymphocytes in peripheral blood and thymus. *Nature.* 1986;324:268-270.
 14. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP, et al. Identification of a putative second T cell receptor. *Nature.* 1986;322:145-149.
 15. Gupta S, Shimizu M, Ohira K, Vayuvegula B. T-cell activation via the T-cell receptor: a comparison between WT31 (defining alpha/beta TCR)-induced and anti-CD3-induced activation of human T lymphocytes. *Cell Immunol.* 1991;132:26-44.
 16. Tax W, Leeuwenberg H, Willems H, Capel P, Koene R. Monoclonal antibodies reactive with OKT3 antigen or OKT8 antigen. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman S, eds. *Leucocyte Typing.* New York, NY: Springer-Verlag; 1984:721-722.
 17. Tax WJ, Willems HW, Reekers PP, Capel PJ, Koene RA. Polymorphism in mitogenic effect of IgG₁ monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells. *Nature.* 1983;304:445-447.



Anti-TCR- γ/δ (11F2)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген TCR- γ/δ .

Форма **Номер по каталогу**
PE **333141**

10/2013

23-13738-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



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

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

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Anti-TCR- γ/δ предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген TCR- γ/δ с использованием проточного цитометра BD FACSTM.

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

Приложения

Экспрессия TCR- γ/δ в исследовании гематологической неоплазии^{1,2}

2. СОСТАВ

Anti-TCR- γ/δ , клон 11F2, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных TCR-комплексом гранулы/CD3/ γ/δ Sepharose[®]*,³ Anti-TCR- γ/δ 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)
PE	50 мкг в 2,0 мл PBS	25

а. Конц. = концентрация

* Sepharose является зарегистрированным товарным знаком GE Healthcare

Чистота антител следующая:

- PE: ≤ 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 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»
- 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.

† Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 10^6 мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) в 50 мкл среды, содержащей 0,1 % азида натрия, в пробирке 12 x 75 мм добавьте 20 мкл реагента.
2. Тщательно перемешайте и инкубируйте в течение 15–30 минут в темном месте при температуре 2–8 °C.
3. Промойте раствором BD CellWASH (или промывочным буфером).
4. 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

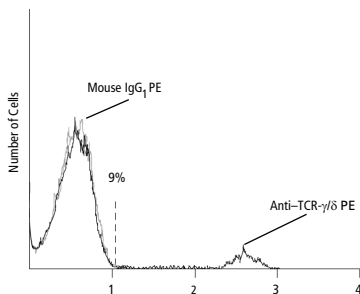
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномальных числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр.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 обычной крови и гейтированные по лимфоцитам.

Лазерное возбуждение при длине волны 488 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

Anti-TCR-γ/δ реагирует с антигенными детерминантами остова γ/δ TCR^{3, 10}. γ/δ TCR является гетеродимерным гликопротеином, нековалентно ассоциирован-

ным с антигеном CD3³, 10–12. γ - и δ -цепи TCR состоят из постоянных и переменных участков, каждый из которых кодируется отдельными генными сегментами¹¹. γ -цепь образует либо дисульфид-связанные, либо дисульфид-несвязанные гетеродимеры с субъединицей δ ³, 10–12.

$\gamma\delta$ TCR присутствует на небольшой субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови, вилочковой железы, селезенки и лимфатических узлов.^{3,10,11} $\gamma\delta$ TCR-положительные Т-лимфоциты составляют от 1 % до 9 % нормальных лимфоцитов периферической крови и менее 2 % нормальных тимоцитов.^{3,10,11}

ПРИМЕЧАНИЕ Anti-TCR- $\gamma\delta$ вызывает митоз $\gamma\delta$ -TCR — несущих Т-лимфоцитов.¹³

Чувствительность

Чувствительность определяется как разрешение разделения популяций Анти-TCR- $\gamma\delta^+$ и анти-TCR- $\gamma\delta^-$. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение анти-TCR- $\gamma\delta^+$ и анти-TCR- $\gamma\delta^-$ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток анти-TCR- $\gamma\delta^+$ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

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 Анти-TCR- $\gamma\delta^+$ лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
PE	8	674,98	76,13	11,28

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 ненарушения патентов. Искключительная 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 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

- Spits H, Paliard X, Vandekerckhove Y, van Vlasselaer P, de Vries JE. Functional and phenotypic differences between CD4+ and CD4- T cell receptor gamma delta clones from peripheral blood. *J Immunol.* 1991;147:1180-1188.
- 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;93-226.
- Borst J, van Dongen J, Bolhuis R, et al. Distinct molecular forms of human T cell receptor $\gamma\delta$ detected on viable T cells by a monoclonal antibody. *J Exp Med.* 1988;167:1625-1644.
- 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.
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, Ruitenberg JJ, Bolhuis RL, Borst J, Phillips JH, Testi R. Structural and serological heterogeneity of $\gamma\delta$ T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood. *Eur J Immunol*. 1988;18:1985-1992.
 11. Lanier LL, Serafini AT, Ruitenberg JJ, et al. The gamma T-cell antigen receptor. *J Clin Immunol*. 1987;7:429-440.
 12. Testi R, Lanier LL. Functional expression of CD28 on T cell antigen receptor $\gamma\delta$ -bearing T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1989;19:185-188.
 13. Lanier LL, Federspiel N, Ruitenberg JJ, et al. The T-cell antigen receptor complex expressed on normal peripheral blood CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes: A CD3-associated disulfide-linked γ chain heterodimer. *J Exp Med*. 1987;165:1076-1094.



BD IntraSure™ Kit

Реагенты для фиксации и пермеабиллизации клеток

50 тестов в комплекте — номер по каталогу 641778

03/2015

23-12582-01



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2015



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

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

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект BD IntraSure™ Kit предназначен для фиксации и пермеабиллизации клеток в целях окрашивания внутриклеточных мишеней с минимальным воздействием на предварительное окрашивание антигенов клеточной поверхности. Сбор данных образцов выполняется на проточном цитометре BD FACST™, оснащённом соответствующим аналитическим программным обеспечением для сбора и анализа данных.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Измерение внутриклеточных мишеней методом проточной цитометрии является важным аналитическим этапом базовой диагностики лейкоemий и лимфом¹⁻⁵. Комплект BD IntraSure* Kit используется в процессе окрашивания внутриклеточных маркеров лейкоemий и лимфом для фиксации исследуемых клеток и повышения проницаемости их мембран для реагентов флуоресцентных антител, что позволяет проводить анализ методом проточной цитометрии.

3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

При инкубации цельной крови с реагентами на основе конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител антитела специфически связываются с соответствующими антигенами лейкоцитов на клеточной поверхности. Комплект BD IntraSure Kit позволяет фиксировать и пермеабиллизировать окрашенные клетки таким образом, что конъюгированные с флуорохромом антитела, направленные против внутриклеточных мишеней, могут

проникнуть в клетки и специфически связаться со своими мишенями. Этапы фиксации и пермеабилзации оказывают минимальное воздействие на предварительное окрашивание маркеров клеточной поверхности. Таким образом становится возможен одновременный анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов методом проточной цитометрии.

4. РЕАГЕНТЫ

Поставляемые реагенты

Комплект BD IntraSure Kit включает 5 мл реагента А — патентованного буферного фиксирующего раствора, содержащего 1 % формальдегида, и 2,5 мл реагента В — патентованного буферного пермеабилзирующего раствора, содержащего детергент.

Меры предосторожности

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

Реагент А содержит 1,0 % формальдегида, номер CAS 50-00-0, и 0,35 % метанола, номер CAS 67-56-1.

	Опасность
	H341 Предположительно вызывает генетические дефекты. H350 Может вызывать рак. Путь воздействия: при вдыхании.
	H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию.

	Опасность
	Пользоваться защитными перчатками / средствами защиты глаз. Пользоваться защитной одеждой. Избегать вдыхания тумана / паров / вещества в распыленном состоянии. В случае воздействия или обеспокоенности: обратиться к врачу. В случае раздражения кожи или появления сыпи: обратиться к врачу. Выполните утилизацию содержимого/контейнера с соблюдением мер предосторожности, описанных в местных/региональных/государственных/международных нормативных требованиях.

- Реагент В содержит в качестве консерванта азид натрия.

Хранение и обращение

Храните флаконы при комнатной температуре (20–25 °C) в темном месте. Не замораживайте. При соблюдении условий хранения каждый реагент стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.

5. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И ВЕЩЕСТВА

- Одноразовые полистирольные пробирки 12 × 75 мм с крышками.
- Микропипетка с наконечниками.
- Мешалка «вортекс».
- Центрифуга.
- Конъюгированные с флуорохромом антитела, пригодные для окрашивания клеточной поверхности, например CD19 APC (номер по каталогу 345791).
- Реагенты на основе конъюгированных с флуорохромом антител, пригодные для внутриклеточного окрашивания, например BD Oncomark™ CD3/Anti-Myeloperoxidase (MPO)/CD79a (номер по каталогу 333164).

- Лизирующий раствор BD FACSTM Lysing Solution, 10-кратный концентрат (номер по каталогу 349202).

Инструкции по разведению и предупреждения см. в руководстве по использованию реагента.

- Раствор BD CellWASH™ (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия.
- Раствор BD CellFIX™ (10-кратный концентрат) (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.

Инструкции по разведению и предупреждения см. в руководстве по использованию реагента.

6. ПРИБОРЫ

Сбор данных образцов проводится на проточном цитометре BD FACSCanto™ или BD FACSCanto™ II с программным обеспечением BD FACSDiva™ или на проточном цитометре BD FACSCalibur™ с программным обеспечением BD CellQuest™ Pro.

Другие реагенты, необходимые для настройки и использования проточного цитометра:

- Проточная жидкость BD FACSTFlow™ Sheath Fluid (номер по каталогу 342003) или аналогичная.

ВНИМАНИЕ! Для разбавления гранул BD Calibrite™ Beads используйте только проточную жидкость BD FACSTFlow Sheath Fluid.

- Гранулы для настройки прибора, например 7-цветные настроечные гранулы BD FACSTM 7-Color Setup Beads (номер по каталогу 335775), набор гранул для 3-цветной настройки BD Calibrite™ 3 Three-Color Kit и гранулы BD Calibrite™ APC Beads (номера по каталогу 340486 и 340487 соответственно) или гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads (номера по каталогу 656046 и 656047).

7. ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ)

Реагенты BD IntraSure можно использовать с образцами периферической крови или костного мозга. Для каждого типа образцов возможны различные условия хранения и ограничения, которые должны быть приняты во внимание до отбора образцов и анализа^{6,7}.

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; должно присутствовать 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.

8. ПРОЦЕДУРА

Перед началом работы

1. Приготовьте не менее 75 мкл клеточной суспензии с концентрацией лейкоцитов не более $2,0 \times 10^7$ клеток/мл.
2. Оцените жизнеспособность клеток; должно присутствовать не менее 80 % жизнеспособных клеток.
3. Приготовьте неконцентрированный лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution.

Инструкции по разведению см. в руководстве по использованию реагента.

Окрашивание и фиксация маркеров клеточной поверхности

1. Перенесите пипеткой 50 мкл клеточной суспензии в пробирку.
2. Если планируется окрашивание клеточной поверхности, добавьте соответствующие реагенты на основе меченных флуорохромом антител и инкубируйте в соответствии с руководствами по использованию реагентов (не обязательно).
3. Добавьте 100 мкл реагента А в каждую пробирку.
4. Перемешайте на «вортексе».
5. Инкубируйте в течение 5 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).

Лизирование и декантирование

1. Добавьте в пробирку 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution.
2. Перемешайте на «вортексе».

3. Инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
4. Центрифугируйте при 800g–850g в течение 5 минут.
5. Декантируйте надосадочную жидкость.

ПРИМЕЧАНИЕ Желательно декантировать, а не аспирировать. При аспирации будьте осторожны, чтобы не повредить клеточный осадок.

Пермеабиллизация и окрашивание внутриклеточных маркеров

1. Перенесите пипеткой 50 мкл реагента В в пробирку.
2. Добавьте реагенты на основе конъюгированных с флуорохромом антител, специфичных к исследуемым внутриклеточным мишеням, в соответствии с руководствами по использованию реагентов антител.
3. Перемешайте на «вортексе».
4. Инкубируйте не менее 15 минут в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).

ПРИМЕЧАНИЕ Продолжительность этапа инкубации, возможно, понадобится оптимизировать для разных реагентов антител.

5. Добавьте в пробирку 2–3 мл раствора BD CellWASH или PBS с 0,1 % азида натрия.
6. Перемешайте на «вортексе».
7. Центрифугируйте при 800g–850g в течение 5 минут.
8. Декантируйте надосадочную жидкость.

ПРИМЕЧАНИЕ Желательно декантировать, а не аспирировать. При аспирации будьте осторожны, чтобы не повредить клеточный осадок.

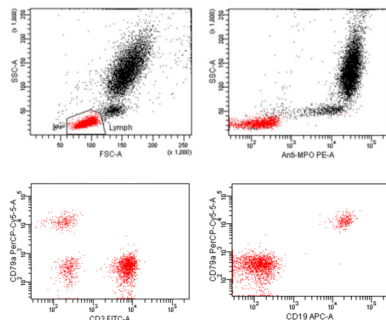
9. Ресуспендируйте клеточный осадок в 0,5 мл раствора BD CellFIX или 1%-го параформальдегида. Перемешайте на «вортексе».
10. Фиксируйте клетки в течение 30 минут в темноте при температуре 2–8 °С.
11. Перед сбором данных встряхните пробирку с образцом на «вортексе».

ПРИМЕЧАНИЕ Условия хранения окрашенных клеток до сбора данных см. в руководстве по использованию реагента.

Проточная цитометрия

На рис. 1 показан сбор и анализ данных образца цельной крови, окрашенного CD3/Anti-MPO/CD79a и CD19 APC в качестве дополнительного реагента. Для фиксации и пермеабилзации клеток использовался комплект BD IntraSure Kit. Лазерное возбуждение проводилось при длинах волн 488 нм и 635 нм.

Рис. 1 Данные, собранные на проточном цитометре BD FACSCanto II и проанализированные с использованием программного обеспечения BD FACSDiva



9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Воспроизводимость

Два оператора выполняли по два независимых тестирования в день на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II в течение восьми дней. Каждый оператор окрашивал по два образца нормальной периферической крови реагентами CD19 PE-CyTM7 и CD3 FITC/anti-MPO/CD79a для каждого тестирования, выполняя фиксацию и пермеабилзацию двумя партиями комплекта BD IntraSure Kit и проводил сбор и анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva. Образцы были гейтированы по соответствующей клеточной популяции (например, по гранулоцитам в случае anti-MPO и по лимфоцитам в случае CD3, CD19 и CD79a).

Общая воспроизводимость была рассчитана для подмножества %P (процент положительных результатов) клеточных популяций. Общая воспроизводимость состоит из четырех компонентов: между оператором/прибором и оператором/прибором, между партиями, между тестированиями и между пробирками. См. табл. 1.

Табл. 1 Воспроизводимость подмножества %P (общая)

Субпопуляция	DF ^a	SD ^b	%CV ^c
%MPO ⁺	120	1,40	2,42
%CD3 ⁺	120	0,74	1,06
%CD79a ⁺	120	0,43	4,89
%CD19 ⁺	120	0,42	4,77

a. DF = степени свободы

b. SD = среднеквадратическое отклонение

c. CV = коэффициент вариации

† CyTM является товарным знаком компании GE Healthcare.

Повторяемость

Два оператора выполняли по два независимых тестирования в день на двух проточных цитометрах BD FACSCanto II в течение восьми дней. Каждый оператор окрашивал по два образца нормальной периферической крови реагентами CD19 PE-Cy7 и CD3/anti-MPO/CD79a для каждого тестирования, выполнял фиксацию и пермеабиллизацию двумя партиями комплекта BD IntraSure Kit и проводил сбор и анализ данных при помощи программного обеспечения BD FACSDiva. Внутрианалитическая сходимость (повторяемость между пробирками) была рассчитана для подмножества %P клеточных популяций. См. табл. 2.

Табл. 2 Повторяемость подмножества %P (между пробирками)

Субпопуляция	DF ^a	SD ^b	%CV ^c
%MPO ⁺	64	0,99	1,72
%CD3 ⁺	64	0,46	0,66
%CD79a ⁺	64	0,34	3,82
%CD19 ⁺	64	0,33	3,76

a. DF = степени свободы

b. SD = среднеквадратическое отклонение

c. CV = коэффициент вариации

Погрешность

116 образцов свежей периферической крови и 104 образца костного мозга, оставшиеся после диагностического тестирования на лейкоми и лимфомы в двух внешних клинических центрах, подверглись оценке на предмет эквивалентности при использовании комплекта BD IntraSure Kit и комплекта FIX & PERM[®] Kit для фиксации и пермеабиллизации клеток.

† FIX & PERM[®] является коллективным зарегистрированным товарным знаком компаний CALTAG и AN-DER-GRUB.

По два образца подверглись окрашиванию CD19 PE-Cy7, фиксации и пермеабиллизации с использованием комплекта BD IntraSure Kit или комплекта FIX & PERM Kit в качестве эталона и окрашиванию на внутриклеточные маркеры с использованием BD Oncomark CD3/Anti-MPO/CD79a. Сбор данных образцов проводился на проточном цитометре BD FACSCanto II с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Для каждого образца высчитывались разность средней интенсивности флуоресценции (дельта MFI) положительной и отрицательной клеточной популяции MPO⁺, CD3⁺, CD79a⁺ и CD19⁺ и подмножество %P клеточных популяций для тех же маркеров. Было рассчитано среднее смещение дельта MFI между образцами, обработанными BD IntraSure и FIX & PERM. См. табл. 3. Были рассчитаны абсолютная разность значений подмножества %P для образцов из группы низкого связывания и относительная разность значений подмножества %P для образцов из группы высокого связывания между образцами, обработанными BD IntraSure и FIX & PERM. См. табл. 4 и табл. 5.

Табл. 3 Среднее смещение значений дельта MFI между BD IntraSure и FIX & PERM

Переменная (MFI)	N ^a	Относительная разность	
		Среднее смещение	SD ^b среднего смещения
CD3	220	165,6	49,3
MPO	219	167,8	70,9
CD79a	209	182,0	36,0
CD19	209	101,1	31,0

a. N = количество образцов

b. SD = среднеквадратическое отклонение

Табл. 4 Абсолютная разность значений подмножества %P между BD IntraSure и FIX & PERM для образцов из группы низкого связывания

Переменная (% подмножества)	№	Абсолютная разность	
		Среднее смещение	SD ^b
CD3	88	1,3	6,5
MPO	54	1,6	6,9
CD79a	119	-0,2	2,5
CD19	119	-0,5	1,8

a. N = количество образцов

b. SD = среднеквадратическое отклонение

Табл. 5 Относительная разность значений подмножества %P между BD IntraSure и FIX & PERM для образцов из группы высокого связывания

Переменная (% подмножества)	№	Относительная разность с эталоном	
		Среднее % смещение	SD ^b
CD3	132	-0,8	13,8
MPO	165	3,3	21,1
CD79a	90	0,6	18,2
CD19	90	-0,4	18,6

a. N = количество образцов

b. SD = среднеквадратическое отклонение

10. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Комплект BD IntraSure Kit предназначен для использования с лизирующим раствором BD FACS Lysing Solution.
- Комплект BD IntraSure Kit повышает проницаемость разных клеточных мембран в разной степени. Поэтому эффективность обнаружения зависит от положения конкретного антигена в клетке.

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.

Для продаваемых согласно данным условиям продуктов ГАРАНТИРУЕТСЯ ТОЛЬКО СОБЛЮЖДЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И СОДЕРЖИМОГО, УКАЗАННЫХ НА ЭТИКЕТКЕ ИЛИ МАРКИРОВКЕ ПРОДУКТА НА МОМЕНТ ДОСТАВКИ 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. Вся ответственность компании BD ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЛИБО ЗАМЕНОЙ ПРОДУКТОВ, ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ПОКУПАТЕЛЮ ЦЕНЫ ПОКУПКИ. Компания BD НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА ПОВРЕЖДЕНИЕ ИМУЩЕСТВА ИЛИ ЛЮБОЕ СОПУТСТВУЮЩИЙ ИЛИ КОСВЕННЫЙ УЩЕБ, ВКЛЮЧАЯ ЛИЧНЫЕ ТРАВМЫ И ЭКОНОМИЧЕСКИЕ УБЫТКИ, ВЫЗВАННЫЕ ДАННЫМ ПРОДУКТОМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennett F, Rawstron A, Plummer M, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle. *Br J Haematol*. 2007;139:600-604.
2. de Tute RM, Jack AS, Child JA, Morgan GJ, Owen RG, Rawstron AC. A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia*. 2007;21:2046-2049.
3. Dworzak MN, Fritsch G, Fröschl G, Printz D, Gadner H. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood*. 1998;92:3203-3209.
4. Letestu R, Rawstron A, Ghia P, et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70:309-314.
5. Nakase K, Sartor M, Bradstock K. Detection of myeloperoxidase by flow cytometry in acute leukemia. *Cytometry*. 1998;34:198-202.
6. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
7. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy PJ, 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.
8. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. M29-A3.

9. 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.



CD16 (NKP15)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD16.

Форма
FITC

Номер по каталогу
335035

12/2013

23-12060-00



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2013



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.bdbiosciences@europe.bd.com

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

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

2. СОСТАВ

CD16, клон NKP15,³⁻⁵ получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных большими гранулярными лимфоцитами.

CD16 (NKP15) 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	250 мкг в 2,0 мл PBS	125

a. Конц. = концентрация

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (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
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Лизирующий раствор BD FACS 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.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

6. ПРОЦЕДУРА

1. К 100 мкл цельной крови в пробирке 12x75 мм добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD16. 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

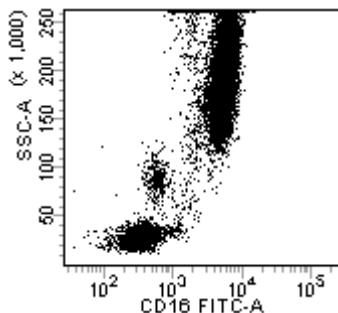
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или аберрантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного

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 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 лизированной 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

Рекомендуем использовать гранулы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™, чтобы настроить напряжение в трубке фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувстви-

тельность 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

Антитела CD16 распознают антиген размером от 50 до 65 килодалтон (кДа), присутствующий на человеческих естественных клетках-киллерах, который является рецептором типа III фрагмента Fc IgG.¹⁰

Антиген CD16 экспрессируется приблизительно на 15 % лимфоцитов периферической крови и присутствует практически на всех покоящихся естественных клетках-киллерах.¹⁰ У некоторых лиц антиген CD16 может экспрессироваться на CD3⁺ Т-лимфоцитах.¹¹ Антиген CD16 также экспрессируется на нейтрофилах.¹² CD16 (B73.1) реагирует с нейтрофилами слабее, чем CD16 (NKP15) и CD16 (GO22).^{13,14}

Переменное количество лимфоцитов CD16⁺ коэкспрессирует антиген CD57, антиген CD8 низкой плотности или оба.^{12,13,14} Естественные клетки-киллеры CD16⁺CD56⁺ характеризуются обратным переносом состояния активации с дендритными клетками.¹⁵

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 (NKP15) 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 NKP15 (известный как Leu-11a) в составе слепой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом 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 парным результатам для каждого образца. Индивидуальные SD группировали для выведения объединенного SD для каждого

реагента, что обеспечивало оценку внутриобразцовой повторяемости.

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

	№	Среднее MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	5	180,21	8,07	4,48

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 использованием релевантных сочетаний реагентов⁵.

Поскольку реагенты можно использовать в различных сочетаниях, лаборатории должны ознакомиться со свойствами каждого антитела в связи с другими марке-

рами 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 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.

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. Phillips JH, Babcock GF. NKP-15: a monoclonal antibody reactive against purified human natural killer cells and granulocytes. *Immunol Lett.* 1983;6:143-149.
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;162:2089-2106.
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, 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.
14. 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.
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. CD16 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; 1995:805-806.



Anti-HLA-DR (L243)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген HLA-DR

Форма	Номер по каталогу	Форма	Номер по каталогу
FITC	347400	APC	347403
PE	347401	APC-Cy7	335831
PerCP	347402	APC-H7	641411
PerCP-Cy5.5	339216	V450	655874
PE-Cy7	335830		

1/2018

23-13692-09



© BD, 2018. 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 Anti-HLA-DR предназначен для диагностической идентификации in vitro клеток, экспрессирующих антиген HLA-DR, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым ПО (таким как клиническое ПО BD CellQuest™, BD CellQuest™ Pro, BD FACSDiva™ или BD FACSCanto™) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя к устройству.

Не для использования при гистотипировании.

Приложения

Экспрессия антигена HLA-DR в исследовании гематологической неоплазии.¹⁻⁸

2. СОСТАВ

Anti-HLA-DR, клон L243, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1/1-Ag4 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированными лимфобластоидными В-клетками человека линии RPMI 8866.⁹ Anti-HLA-DR состоит из мышиных тяжелых цепей Mouse IgG_{2a} и легких каппа-цепей.

Каждый из нижеприведенных реагентов поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), а также желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1 Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC	50,0 мкг в 2,0 мл PBS	25,0
PE	25,0 мкг в 2,0 мл PBS	12,5

Таблица 1 Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
PerCP	25,0 мкг в 2,0 мл PBS	12,5
PerCP-Cy TM 5.5 ^b	6 мкг в 1,0 мл PBS	6
PE-Cy TM 7	25,0 мкг в 0,5 мл PBS	50,0
APC	25,0 мкг в 0,5 мл PBS	50,0
APC-Cy7	25,0 мкг в 0,5 мл PBS	50,0
APC-H7	25,0 мкг в 0,5 мл PBS	50,0
BD Horizon TM V450	25,0 мкг в 0,5 мл PBS	50,0

a. Конц. = концентрация

b. CyTM — 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: ≤5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, APC-H7, V450: ≤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 с крышками
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Центрифуга
- Лизирующий раствор BD FACSTM lysing solution (10X) (номер по каталогу 349202).

Инструкции по разбавлению и предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.

- BD CellWASHTM (номер по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- Буферный раствор для окрашивания, состоящий из PBS с 0,2 % бычьего сывроточного альбумина (BSA) и 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.

- Стабилизирующий фиксатив BDTM Stabilizing Fixative (3X) (номер по каталогу 339860)

Инструкции по разбавлению и предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.

- Гранулы BD CalibriteTM Beads

Подробные сведения см. на сайте bdbiosciences.com.

- Семицветные настроечные гранулы BD FACST[™] 7-color setup beads (номер по каталогу 335775)
- Гранулы BD T[™] Multicolor CompBeads (номер по каталогу 644204)
- Гранулы BD FACSDiva[™] CS&T IVD Beads (номера по каталогу 656046 и 656047)
- Проточный цитометр BD FACS

Подробности см. в руководстве пользователя цитометра.

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^{10,11}.

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. Было предложено вводить поправки при, по меньшей мере, 80 % жизнеспособных клеток.¹⁰

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Все биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, считаются биологически опасными. Обращайтесь с ними как с потенциальными источниками инфекции^{12,13} и при утилизации соблюдайте меры безо-

пасности, 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

Окрашивание образцов

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

Относительно объема см. соответствующую маркировку пузырька.

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе» и инкубируйте в течение 15–30 в темноте при комнатной температуре (20–25 °C).
3. Добавьте 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS в каждую пробирку.
4. Мягко встряхните пробирки на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте пробирки при 300g в течение 5 минут.
6. Отделите супернатант аспирацией.
7. Добавьте 2 мл буфера в каждую пробирку в соответствии с используемым флуорохромом (табл. 2). «Да» в обоих

столбцах означает, что можно использовать любой буфер.

Таблица 2 Рекомендуемый буфер

Флуорохром	Буфер окрашивания	BD CellWASH
FITC	Да	Да
PE	Да	Да
PerCP	Не проверялось	Да
PerCP-Cy5.5	Да	Да
PE-Cy7	Да	Да
APC	Да	Да
APC-Cy7	Не проверялось	Да
APC-H7	Да	Да
V450	Не проверялось	Да

8. Центрифугируйте пробирки при 300g в течение 5 минут.
9. Отделите супернатант аспирацией.
10. Добавьте 0,5 мл буфера в каждую пробирку согласно табл. 2 и немедленно проанализируйте образцы или добавьте фиксатив согласно табл. 3.

Добавление фиксатива

1. Добавьте 0,5 мл фиксатива согласно табл. 3. «Да» в обеих колонках означает, что можно использовать любой буфер.

ВНИМАНИЕ! Для многоцветного анализа с применением PE-конъюгата

используйте BD CellFIX или 1%-й раствор параформальдегида.

Таблица 3 Совместимый фиксатив

Флуорохром	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентрированный стабилизирующий фиксатив BD Stabilizing Fixative
FITC	Да	Нет
PE	Да	Нет
PerCP	Да	Нет
PerCP-Cy5.5	Да	Нет
PE-Cy7	Да	Да
APC	Да	Нет
APC-Cy7	Да	Да
APC-H7	Да	Да
V450	Да	Нет

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе».

3. Инкубируйте пробирки при 2–8 °С в темноте согласно табл. 4.

Таблица 4 Рекомендуемая процедура инкубации

	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентри- рованный ста- билизирую- щий фиксатив BD Stabilizing Fixative
Период инкуба- ции	60 минут	30 минут
Дополнитель- ные этапы	1. Центрифугируйте пробирки при 300g в течение 5 минут. 2. Отделите супернатант аспирацией. 3. В каждую пробирку добавьте 0,5 мл буфера окрашивания и аккуратно перемешайте на «вортексе».	Нет

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты APC-Cy7 и в меньшей степени — конъюгаты PE-Cy7 и APC-H7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида или света. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

ВНИМАНИЕ! Не храните PE-конъюгаты в стабилизирующем фиксативе BD, так как это может вызвать уменьшение интенсивности окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Длительное воздействие параформальдегида на клетки может привести к повышенной аутофлуоресценции в фиолетовых каналах.

Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

4. Тщательно перемешайте содержимое пробирок перед анализом.

До анализа храните пробирки при 2–8 °С. Мы рекомендуем анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

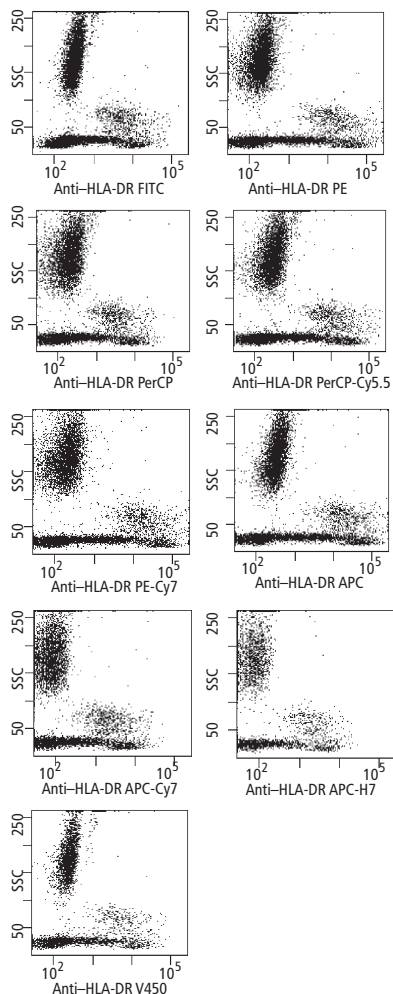
Аналитические результаты

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 цитометр.¹⁴ 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 лизированной цельной крови и гейтированные по моноцитам и гранулоцитам. Лазерное возбуждение проводилось при длине волны 405, 488 и 635 nm.

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



Внутренний контроль качества

Настройка цитометра зависит от используемого флуорохрома и типа цитометра.

Данные о методах настройки, пригодных для цитометра и специфически меченого флуорохрома, см. в табл. 5. Методы настройки приведены после табл. 5.

Таблица 5 Метод настройки, рекомендуемый для сочетаний цитометра и флуорохрома

Флуорохром	BD FACS Canto II	BD FACS Canto	BD FACS Calibur
FITC	1, 2, 4	2	3
PE	1, 2, 4	2	3
PerCP	2	2	3
PerCP-Cy5.5	1, 2, 4	2	3
PE-Cy7	1, 2, 4	2	Н/Д
APC	1, 2, 4	2	3
APC-Cy7	2, 4	2	Н/Д
APC-H7	1, 4	2	Н/Д
V450	4	Н/Д	Н/Д

Метод настройки 1

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-H7:

1. Используйте семицветные настроенные гранулы BD FACS 7-color setup beads и клиническое ПО BD FACSCanto clinical software для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.
2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмычкой из клинического программного обеспечения BD FACSCanto clinical software с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva версии 7.0.

Подробнее см. *BD FACSDiva Software Reference Manual for Version 7.0* (Справочное руководство по программному обеспечению BD FACSDiva версии 7.0).

3. Выберите **Overwrite (Перезаписать)** в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch (Несовпадение настроек цитометра)**, чтобы связать значения напряжения ФЭУ.

При этом название параметра изменится с **APC-H7** на **APC-Cy7**. Несовпадающие параметры будут удалены.

ВНИМАНИЕ! При выборе **Apply (Применить)** в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch (Несовпадение настроек цитометра)**, напряжение ФЭУ для APC-Cy7 не будет связано с настройкой LW, и текущие настройки напряжения PMT и параметр названия не изменятся.

4. Запишите значение напряжения ФЭУ для параметра APC-Cy7, отмените связь с параметрами приложения лизирования с отмывкой и измените метку параметра **APC-Cy7** на **APC-H7**.
5. Введите значение напряжения ФЭУ для APC-Cy7, записанное для параметра APC-H7.
6. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и ПО BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство по эксплуатации *BD™ Multicolor CompBeads*.

Метод настройки 2

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-Cy7:

1. Используйте семицветные настроечные гранулы BD FACS 7-color setup beads и клиническое ПО BD FACSCanto clinical software для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (PMT) и проверки чувствительности цитометра.
2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмывкой из клинического программного обеспечения BD FACSCanto clinical software с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva.
3. Выберите **Overwrite (Перезаписать)** в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch (Несовпадение настроек цитометра)**, чтобы связать значения напряжения ФЭУ и настройки компенсации для всех параметров. Несовпадающие параметры будут удалены.

ПРИМЕЧАНИЕ В случае использования лазерной конфигурации 4-2H-2V (конфигурации BD по умолчанию) при выборе **Overwrite (Перезаписать)** название параметра изменится с **APC-H7** на **APC-Cy7**.

ВНИМАНИЕ! При выборе **Apply (Применить)** в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch (Несовпадение настроек цитометра)**, связаны будут только настройки для параметров, совпадающие с приложением лизирования с отмывкой. При использовании лазерной конфигурации 4-2H-2V и выборе **Apply (Применить)** значения напряжения ФЭУ и настройки компенсации для APC-Cy7 связаны не будут. Название параметра останется **APC-H7**.

Метод настройки 3

Используйте BD Calibrite шарики и BD FACSComp™ клиническое ПО для установки напряжения PMT и компенсации флуоресценции, чтобы проверить чувствительность цитометра.

Метод настройки 4

Рекомендуется при использовании 8-цветного сочетания реактивов, которое включает фиолетовые флуорохромы:

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads и программное обеспечение BD FACSDiva версии 7.0 для настройки значений напряжения ФЭУ. Подробнее см. руководство по эксплуатации гранул *BD FACSDiva CS&T IVD Beads*.
2. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и ПО BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство пользователя цитометра и руководства по эксплуатации.

Мы рекомендуем ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек цитометра и для проверки системы управления качеством.¹⁵

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Anti-HLA-DR распознает антиген человеческого главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса II.^{9,16} Данный антиген — это трансмембранный гликопротеин, состоящий из субъединиц α и β молекулярной массой 36 и 27 килодальтонов (кДа) соответственно.^{9,16}

HLA-DR экспрессируется в В-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, активированных Т-лимфоцитах, активированных естественных клетках-киллерах (NK) и недифференцированных клетках-предшественниках человека.^{17–22} Он также присутствует в тимусном эпителии, В-лимфоцит-зависимых областях селезенки и лимфоузлов и В-клеточных лимфомах.^{21–25}

Чувствительность

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

Воспроизводимость

Anti-HLA-DR, клон L243, был впервые описан в 1980 г.⁹ С тех пор множество многодонорных и многоцентровых исследований использовало клон L243 для идентификации HLA-DR.^{26–30} Кроме того, клон L243 используется для надежной идентификации кластера антигена ГКГС класса II.³¹

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 6. 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 6 Повторяемость медианной интенсивности флуоресценции (MFI) HLA-DR⁺ моноцитов по разным партиям и многим донорам (N)^a (N)

Флуорохром	N ^b	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^c
FITC	7	138,95	13,86	9,97
PE	6	342,00	59,46	17,39
PerCP	8	351,82	75,12	21,35
PerCP-Cy5.5	3	1656,7	169,03	10,20
PE-Cy7	4	969,3	96,46	9,95
APC	3	1005,86	191,71	19,06
APC-Cy7	3	509,5	26,92	5,28
APC-H7 ^d	64	2833,0	71,25	2,51
V450 ^d	64	8198,9	188,0	2,3

a. За исключением APC-H7 и V450, которые тестировались с одиночной партией контроля BD™ Multi-Check.

b. N = количество образцов

c. CV = коэффициент вариации

d. Данные собраны как медианная интенсивность флуоресценции.

Погрешность

Данные о погрешности были собраны на проточном цитометре BD FACScan™ с использованием программного обеспечения BD Simulset™ для определения активированных Т-лимфоцитов (HLA-DR⁺) в лизированной цельной крови. Результаты по реагенту BD Simulset™ CD3/Anti-HLA-DR сравнили с результатами по

набору реагентов BD Simulset™ Immune Monitoring. См. табл. 7.

Таблица 7 Перекрестный анализ реагента BD Simulset CD3/Anti-HLA-DR и набора реагентов BD Simulset Immune Monitoring

Флуорохром	N ^a	r ²	Кэф-фици-ент	Сво-бод-ный член	Диа-пазон (%)
CD3/HLA-DR	27	0,92	1,06	0,34	4–51

a. N = количество образцов

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Только для диагностики in vitro.
- Не для использования при гистотипировании.
- 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 данному лечению. Компания BD Biosciences не оценивала влияние присутствия терапевтических антител на функциональные свойства этого реактива.
- Отдельные реагенты могут давать только ограниченную информацию при анализе лейкоцитов и лимфов. Использование сочетаний реагентов может дать больше информации, чем использование индивидуальных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием релевантных сочетаний реагентов¹¹.

- 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 реактива обычно собирают 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. Искключительная 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
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 цитометра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Venditti A, Del Poeta G, Stasi R, et al. Triple immunofluorescence evaluation of CD15, CD34 and class II expression by flow cytometry in normal and leukemic bone marrows. *Haematologica*. 1993;78:359-363.
2. Dorak MT, Lawson T, Machulla HK, Darke C, Mills KI, Burnett AK. Unravelling an HLA-DR association in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999;94:694-700.
3. Lazarchick J, Hopkins M. HLA-Dr negative acute non-lymphocytic leukemia. *Ann Clin Lab Sci*. 1998;28:150-152.
4. Paietta E, Andersen J, Gallagher R, et al. The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study. *Leukemia*. 1994;8:1108-1112.
5. Macedo A, Orfao A, Gonzalez M, et al. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia*. 1995;9:993-998.

6. Vaughan WP, Civin CI, Weisenburger DD, et al. Acute leukemia expressing the normal human hematopoietic stem cell membrane glycoprotein CD34 (My10). *Leukemia*. 1988;2:661-666.
7. Borowitz MJ, Gockerman JP, Moore JO, et al. Clinicopathologic and cytogenic features of CD34 (My 10)-positive acute nonlymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 1989;91:265-270.
8. Porwit-MacDonald A, Janossy G, Ivory K, et al. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21). *Blood*. 1996;87:1162-1169.
9. Lampson LA, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol*. 1980;125:293-299.
10. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
11. 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.
12. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition*; . Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. M29-A3.
13. 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.
14. 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.
15. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry: Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.CLSIdocument H42-A2.
16. Brodsky FM. A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes. *Immunogenetics*. 1984;19:179-194.
17. Tomkinson BE, Wagner DK, Nelson DL, Sullivan JL. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J Immunol*. 1987;139:3802-3807.
18. Levacher M, Tallet S, Dazza M, Dournon E, Roueux B, Pocard JJ. T activation marker evaluation in ARC patients treated with AZT: comparison with CD4+ lymphocyte count in non-progressors and progressors towards AIDS. *Clin Exp Immunol*. 1990;81:177-182.
19. Stites DP, Casavant CH, McHugh TM, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986;38:161-177.
20. Terstappen LWM, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol*. 1990;48:138-148.
21. Warnke R, Levy R. Detection of T and B cell antigens hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem*. 1980;28:771-776.
22. Edwards JA, Durant BM, Jones DB, Evans PR, Smith JL. Differential expression of HLA class II antigens in fetal human spleen: relationship of HLA-DP, DQ, and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol*. 1986;137:490-497.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Hulstaert F, Hannel I, Deney V, et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. II. Varying kinetics of percentage and absolute count measurements. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;70:152-158.
27. Tollerud DJ, Ildstad ST, Morris Brown L, et al. T-cell subsets in healthy teenagers: transition to the adult phenotype. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990;56:88-96.
28. O'Gorman MRG, Millard DD, Lowder JN, Yorgev R. Lymphocyte subpopulations in healthy 1-3-day-old infants. *Cytometry*. 1998;34:235-241.
29. Schuerch C III, Fleetwood M, Glidewell O, Goodspeed N, Maier B. Lymphocyte subsets and activation antigens in a reference population: a flow

- cytometric study using single and double antibody staining. *Immunol Invest.* 1987;16:345-360.
30. Shahabuddin S. Quantitative differences in CD8⁺ lymphocytes, CD4/CD8 ratio, NK cells, and HLA-DR⁺-activated T cells of racially different male populations. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;75:168-170.
31. Geisberg M, Stole E, Knowles R. Biochemical cluster analysis of NK and non-lineage antigens expressed on large granular lymphocytic leukaemia cells. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:729-736.



BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads

Номер по
каталогу
656046

Объем

Один флакон
объемом 3 мл

656047

Три флакона
объемом по 3 мл

7/2014

23-13331-02



BD, логотип BD и все остальные товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © BD, 2014



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

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

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads предназначены для диагностики in vitro на проточных цитометрах BD FACSCanto™ II с программным обеспечением BD FACSDiva™. Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads используются для настройки цитометра, выполнения ежедневных процедур контроля качества и определения параметров приложения лизирования с отмывкой.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

С помощью гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads программа автоматически выполняет оценку и отслеживание показателей цитометра, а также создает отчеты об этих показателях. За определение базовых показателей цитометра отвечают автоматические алгоритмы. После определения базовых целевых значений средней интенсивности флуоресценции (MFI) выполняются процедуры ежедневной проверки с использованием гранул. Кроме того, гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads служат для сброса целевых значений средней интенсивности флуоресценции при переходе к новой партии гранул.

Также с помощью гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads можно вручную определить параметры приложения лизирования с отмывкой. Сохраненные параметры приложения автоматически обновляются после выполнения пользователем ежедневной проверки с учетом показателей работы прибора в этот день.

3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads окрашиваются флуорохромами, которые активируются лазерами цитометра. Гранулы флуоресцируют; флуоресценция фиксируется детекторами, соответствующими конкретному типу флуорохрома (см. табл. 1).

Таблица 1 Флуорохромы, совместимые с гранулами BD FACSDiva CS&T IVD

Флуорохромы	Лазер для возбуждения	Диапазон излучения (нм)
FITC, PE, PerCP-Cy TM 5.5 ^a , PE-Cy TM 7	Синий	500–800
APC, APC-Cy7 ^b , APC-H7	Красный	650–800
BD Horizon TM V450, BD Horizon TM V500-C	Фиолетовый	420–700

a. CyTM — 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 по адресу BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

b. APC-Cy7: патент США № 5714386

Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads состоят из равных количеств ярких (3 мкм), средних (3 мкм) и темных (2 мкм) полистирольных гранул. На следующих рисунках представлен анализ гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads с помощью проточной цитометрии. Данные были получены на проточном цитометре BD FACSCanto II и программном обеспечении BD FACSDiva. Лазерное возбуждение проводилось при длине волны 488 нм.

Рис. 1 Точечный график, изображающий гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads

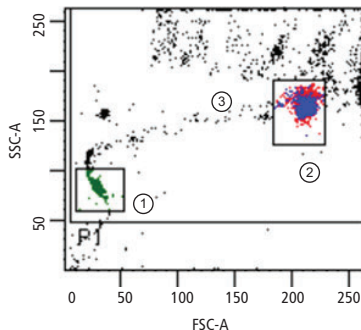
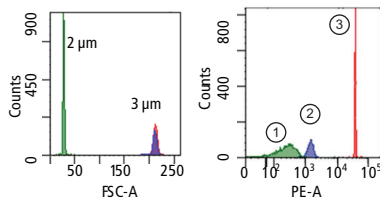


Рис. 2 Гистограммы, отображающие размер и разделение гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads



№	Описание
1	Темные
2	Средний
3	Яркие

Для всех типов гранул в детекторах флуоресценции измеряются средняя интенсивность флуоресценции (MFI) и устойчивый коэффициент вариации (rCV). Алгоритмы программного обеспечения различают сигнал флуоресценции каждого типа гранул, исходя из их размера и интенсивности флуоресценции в каждом детекторе. Программное обеспечение использует полученные данные для расчета и состав-

ления отчетов о различных вариантах измерений параметров, включая линейность, относительную эффективность детектирования флуоресценции (Qr), относительный шум (Br), стандартное отклонение электронных шумов (SD_{EN}) и задержку лазера.

4. РЕАГЕНТЫ

Поставляемые реагенты

Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads поставляются в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) с альбумином бычьей сыворотки (BSA) и 0,1 % азида натрия в следующем виде.

- Один флакон объемом 3 мл (номер по каталогу 656046)
- Три флакона объемом по 3 мл (номер по каталогу 656047)
- Карточка с целевыми значениями MFI для всех детекторов флуоресценции

Каждый флакон объемом 3 мл содержит достаточное количество гранул для выполнения 50 анализов (при анализе используется одна капля гранул).

Необходимые, но не поставляемые реагенты или вещества

- Одноразовые полистирольные пробирки 12 x 75 мм с крышками
- Проточная жидкость BD FACSTFlow™ sheath fluid (номер по каталогу 342003)

Меры предосторожности

- Только для диагностики in vitro.
- Не подвергайте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads воздействию солнечных лучей.

- Не используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads без предварительного разбавления проточной жидкостью BD FACSTFlow sheath fluid, как указано в разделе 6, Приготовление суспензии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads. Использование разбавителя, отличного от проточной жидкости BD FACSTFlow sheath fluid, может привести к неточным результатам настройки.
- Не используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads с истекшим сроком годности или после истечения стабильного периода пригодности для использования после разбавления, как описано в Хранение и обращение разделе. Гранулы, использованные после истечения стабильного периода, начинают утрачивать флуоресценцию, что может привести к неточным результатам настройки.
- Убедитесь, что в текущей партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads имеется достаточное количество свободных гранул для сброса целевых значений при переходе на новую партию гранул (см. табл. 2). Если в текущей партии отсутствует необходимое количество гранул для сброса целевых показателей, необходимо определить новые базовые показатели, используя новую партию гранул.
- Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads содержат в качестве консерванта азид натрия.

Хранение и обращение

- Храните флаконы в темном месте при температуре 2–8 °C. Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- После разбавления гранулы остаются стабильными в течение 8 часов при температуре 2–25 °C.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Храните разбавленные суспензии гранул в темном месте. Некоторые из красителей, использованных при производстве гранул, являются высоко светочувствительными. Уровень флуоресценции может измениться, если подвергать гранулы воздействию солнечных лучей более 20 минут.

5. ПРИБОР

Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads предназначены для использования на проточном цитометре BD FACSCanto II с 3-лазерной, 8-цветной конфигурацией (4-2-2) (BD по умолчанию) (4-2H-2V) и программным обеспечением BD FACSDiva версии 7.0 или выше.

6. ПРОЦЕДУРА

См. раздел 4 для получения сведений о реагентах, необходимых для процедуры. Внимательно прочтите положения Меры предосторожности и Хранение и обращение в данном разделе

Приготовление суспензии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads

Чтобы приготовить гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads для сбора данных, с точностью выполните описанные ниже инструкции в соответствии с выполняемыми задачами.

1. Наклейте этикетку на полистирольную пробирку 12 x 75 мм с крышкой в соответствии с табл. 2 и выполняемой задачей.
2. Тщательно встряхните флакон с гранулами BD FACSDiva CS&T IVD Beads.
3. Приготовьте разбавленные гранулы в соответствии с табл. 2 и выполняемой задачей.

Предупреждение Не допускайте вытекания гранул из пробирки при разбавлении. Это может привести к уменьшению количества гранул при сборе данных.

4. Перед использованием осторожно поместите пробирку на ворткекс.

Таблица 2 Приготовление гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads

Задача	Добавьте...		В пробирку с этикеткой...
	Проточная жидкость BD FACSheath fluid f(мл)	гранулы (количество капель)	
Определение базовых показателей	0,5	3	гранулы для настройки
Проверка характеристик	0,35	1	гранулы для настройки
Определение параметров приложения лизирования с отмывкой	1	2	гранулы для настройки
Сброс целевых значений	0,5	3	Старая партия
	0,5	3	Новая партия

ПРИМЕЧАНИЕ Не разбавляйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads сильнее, чем рекомендовано.

Настройка цитометра с помощью гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads

В следующей таблице представлен обзор процедур, необходимых для настройки прибора и установки параметров приложения лизирования с отмывкой с помощью гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads: импорт и проверка файла партии гранул, определение базовых показателей цитометра, проверка характеристик цито-

метра, определение параметров приложения лизирования с отмывкой и сброс целевых значений для новой партии гранул. Эти задачи описаны в табл. 3.

Таблица 3 Задачи гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads

Задача	Время выполнения	Кем выполняется
Импорт файла партии гранул	Каждый раз при использовании новой партии гранул	Администратор
Определение базовых показателей	При начальной настройке, после сервисного обслуживания и после истечения срока действия базовых показателей	Администратор
Проверка характеристик	Ежедневно	Любой оператор
Определение параметров приложения лизирования с отмывкой	Каждые 7 дней после определения новых базовых показателей и после сброса целевых значений для новой партии гранул	Любой оператор
Сброс целевых значений	Каждый раз при использовании новой партии гранул	Администратор

Открытие рабочей области BD Cytometer Setup and Tracking

1. Запустите проточный цитометр BD FACSCanto II и компьютер.
2. Запустите программное обеспечение BD FACSDiva.
3. Запустите компоненты проточной системы.
4. Выберите **Cytometer (Цитометр) > CST** после завершения прогрева лазера.

Откроется рабочая область BD™ Cytometer Setup and Tracking (CS&T).

5. Запустите задачи CS&T.

Импорт файла партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads

Перед использованием новой партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads администратор должен загрузить соответствующий файл партии гранул. Программное обеспечение BD FACSDiva использует информацию в данном файле для оценки цитометра и нормализации одной партии гранул с другой при переключении между партиями гранул.

Чтобы загрузить файл партии гранул:

1. Посетите наш веб-сайт (<http://www.bdbiosciences.com/eu/support>) и перейдите на страницу файлов партий гранул BD FACSDiva CS&T Bead Lot Files.
2. Загрузите соответствующий файл партии гранул на рабочий компьютер или на флэш-накопитель USB и сохраните этот файл в папку

- **Windows XP, BD FACSDiva версии 7.0:** C:\ProgramFiles\BD FACSDiva Software\CST\BeadLot
- **Windows 7, BD FACSDiva версии 8.0:** D:\BD\FACSDiva\CST\Bead Lot

ПРИМЕЧАНИЕ Убедитесь, что загруженный файл партии гранул соответствует текущей партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads.

3. Войдите в программное обеспечение BD FACSDiva как администратор.
4. В рабочей области BD FACSDiva выберите **Cytometer (Цитометр) > CST**. В рабочей области BD FACSDiva CS&T выберите **Tools (Инструменты) > Bead Lots (Партии гранул)** и выполните следующие действия.

- Убедитесь, что отображается вкладка **Setup Beads** (гранулы для настройки); что выбрана используемая партия гранул; и что в соответствующих полях отображаются номер партии гранул, идентификатор партии и срок годности.
 - Если партия гранул не отображается в списке **Lot IDs** (Идентификаторы партий), перейдите к шагу 5.
5. В диалоговом окне **Bead Lots (Партии гранул)** щелкните **Import (Импортировать)**.
Откроется диалоговое окно папки партий гранул.
 6. Выберите файл партии гранул (с разрешением .bls). Щелкните **Open (Открыть)**.
Информация о партии гранул добавится автоматически.
 7. Закройте диалоговое окно **Bead Lots (Партии гранул)**.

ПРИМЕЧАНИЕ Если доступ в Интернет отсутствует и вы не можете загрузить файл партии гранул, свяжитесь со службой научной поддержки BD Biosciences или местным представителем BD Biosciences.

Определение базовых показателей

При начальной настройке, после сервисного обслуживания прибора и после истечения срока действия базовых показателей (см. табл. 3) нужно определить базовые показатели цитометра, перейдя в окно **Setup Control** (Управление настройками) в рабочей области BD FACSDiva CS&T и выполнив следующее:

1. Выберите **Define Baseline (Определить базовые показатели)** в меню **Characterize (Оценка)**.
2. Установите флажок **Load Tube Manually (Загрузить пробирку вручную)**.
3. Убедитесь, что выбранный идентификатор партии гранул для настройки соответствует текущей партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads. В противном случае, выберите правильный идентификатор партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads в раскрывающемся меню **Lot ID (Идентификатор партии)**.
4. Убедитесь, что выбрана конфигурация цитометра 4-2H-2V.
5. Щелкните **Run (Выполнить)**.
Откроется диалоговое окно с запросом на загрузку пробирки с гранулами BD FACSDiva CS&T IVD Beads в цитометр.
6. Установите пробирку в цитометр. Щелкните **OK**.
Откроется окно **Running Cytometer Baseline** (Базовые показатели цитометра).
7. После просмотра **Optimized PMTVs Results** (Оптимальные результаты PMTVs) щелкните **Continue Setup (Продолжить настройку)**.
8. После просмотра **Target Values Results** (Результаты с целевыми значениями) щелкните **Continue Setup (Продолжить настройку)**.
9. Удалите пробирку из цитометра при появлении соответствующего запроса.
10. Чтобы просмотреть **Baseline Report** (Отчет по базовым показателям), щелкните **View Report (Просмотреть отчет)**. Чтобы распечатать его, выберите **File (Файл) > Print (Печать)**.

11. Для завершения определения базовых показателей и возврата в окно Setup (Настройка) рабочей области щелкните **Finish (Готово)**.

12. Выполните проверку характеристик.

Проверка характеристик

Проверку характеристик следует выполнять каждые 24 часа и после определения базовых показателей.

1. В окне **Setup Control (Управление настройками)** выберите **Check Performance (Проверить характеристики)** в меню **Characterize (Оценка)**.
2. Установите флажок **Load Tube Manually (Загрузить пробирку вручную)**.
3. Убедитесь, что выбранный идентификатор партии гранул для настройки соответствует текущей партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads. В противном случае, выберите правильный идентификатор партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads в раскрывающемся меню **Lot ID (Идентификатор партии)**.
4. Убедитесь, что выбрана конфигурация цитометра 4-2H-2V.
5. Установите пробирку в цитометр.
6. Щелкните **Run (Выполнить)**. Щелкните **OK**, чтобы подтвердить, что пробирка загружена.

Откроется окно Checking Cytometer Performance (Проверка характеристик цитометра). После завершения проверки характеристики откроется диалоговое окно с запросом на удаление пробирки. После завершения настройки откроется второе диалоговое окно.

7. Чтобы просмотреть Cytometer Performance Report (Отчет о проверке цитометра), щелкните **View Report (Просмотреть отчет)**. Чтобы распечатать его, выберите **File (Файл) > Print (Печать)**.

8. Для завершения проверки характеристик и возврата в окно Setup (Настройка) рабочей области щелкните **Finish (Готово)**.

9. Просмотрите состояние базовых показателей и результаты проверки характеристик цитометра в представлении System Summary (Сводка системы) (см. рис 3).

Рис. 3 Представление System Summary (Сводка системы) отчета Cytometer Performance Report (Отчет о характеристиках цитометра)



- Если проверка характеристик цитометра завершилась успешно, то результат проверки характеристик цитометра обозначается как Passed (Успешно). Если проверка завершилась неуспешно, то результат обозначается как Failed (Сбой).

ПРИМЕЧАНИЕ Дополнительные сведения можно получить в строке Cytometer Performance (Характеристики цитометра) в представлении System Summary (Сводка системы) (см. рис. 3). Если строка Cytometer

Performance (Характеристики цитометра) отображает сообщение *Completed with warnings* (Завершено с предупреждениями) вместе с датой, то просмотрите отчет для устранения неисправностей, а затем продолжите работу (см. Поиск и устранение неисправностей).

10. Для отслеживания характеристик цитометра перейдите на вкладку **Performance Tracking (Отслеживание характеристик)** в рабочей области BD FACSDiva CS&T.

ПРИМЕЧАНИЕ Данные отчета о характеристиках цитометра отображаются в виде графиков Леви-Дженнингса. Можно выбрать до 30 критериев для одновременного просмотра.

11. Выберите **File (Файл) > Exit (Выйти)**.

Рабочая область BD FACSDiva CS&T закроется и снова откроется рабочая область BD FACSDiva.

Определение параметров приложения лизирования с отмывкой

Определяйте параметры приложения лизирования с отмывкой каждые 7 дней, после определения новых базовых показателей и после сброса целевых значений для новой партии гранул (см. табл. 3).

ПРИМЕЧАНИЕ Для установки параметров приложения лизирования с отмывкой потребуется пробирка с гранулами BD FACSDiva CS&T IVD Beads, пробирка с обработанными клетками и карта с целевыми значениями MFI для идентификатор партии используемых гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads.

1. Приготовьте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads, как описано в табл. 2.

2. В рабочей области BD FACSDiva убедитесь, что выбрана конфигурация цитометра 4-2H-2V.
3. Создайте новый эксперимент в окне Browser (Браузер) или в отдельной папке окна Browser (Браузер). Убедитесь, что используются параметры BD FACSDiva CS&T.

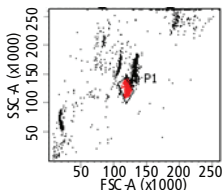
ПРИМЕЧАНИЕ Если отображается диалоговое окно CST Mismatch (Несовпадение CST), щелкните **Use CST Settings (Использовать параметры CST)**.

4. Добавьте в эксперимент образец.
 5. Создайте следующие элементы анализа в общем рабочем списке.
 - Отобразите точечный график FSC-A к SSC-A с многоугольным гейтом (P1) (см. рис. 4).
 - Отобразите восемь гистограмм (для каждого параметра флуоресценции) с помощью измерения области, с отдельными гейтами интервалов на каждой гистограмме, показывающими только события P1 (см. рис. 5).
- ПРИМЕЧАНИЕ** Для отображения только событий P1, выберите все гистограммы, щелкните по ним правой кнопкой мыши и выберите **Show Populations (Показать популяции) > P1**.
- Выберите биэкспоненциальное отображение для каждой гистограммы и задайте точки для отображения кумулятивных событий.

- Создайте отдельное представление Statistics View (Статистическое представление). Отредактируйте статистическое представление для отображения медиан каждого параметра.
6. Определите напряжение датчиков, чтобы поместить гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads с целевыми значениями.
- Установите пробирку с гранулами BD FACSDiva CS&T IVD Beads в цитометр.
 - Установите расход Medium (Средний).
 - Щелкните **Acquire (Сбор)** и настройте гейт P1 для отдельной популяции гранул 3 мкм (см. рис. 4).

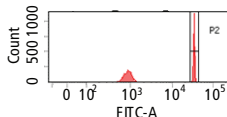
ПРИМЕЧАНИЕ Убедитесь, что гейт P1 содержит только отдельные гранулы 3 мкм. При необходимости увеличьте график FSC-A к SSC-A, настройте гейт и уменьшите график.

Рис. 4 Точечный график FSC-A к SSC-A, показывающий гейт P1 вокруг отдельной популяции гранул 3 мкм



- Отрегулируйте значения напряжения детекторов флуоресценции, чтобы поместить яркие гранулы BD FACSDiva CS&T 3 мкм в пределах заданного диапазона целевых значений MFI для каждого параметра на карте, поставленной BD. Убедитесь, что номер партии гранул на карте соответствует идентификатору партии используемых гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads.
- Проанализируйте каждую гистограмму, чтобы убедиться, что гейт интервалов включает пик ярких гранул 3 мкм (см. рис. 5). Если пик имеет ответвление, не включайте его в гейт, так как оно содержит смеси гранул, а не отдельные гранулы.

Рис. 5 Гистограмма, показывающая пик ярких гранул 3 мкм для FITC



- Щелкните **Stop (Сноп)**. Распечатайте копию рабочего списка.
7. Определите FSC, SSC и пороговые значения для клеток, которые будут собраны с помощью данных параметров приложения.
- Установите пробирку с образцом клеток в цитометр.

- В окне Experiment Browser (Браузер эксперимента) установите указатель текущей пробирки на пробирку, которая использовалась для установки значений напряжения PMT, щелкните **Acquire (Сбор)** и отрегулируйте напряжение детекторов FSC и SSC, чтобы поместить нужные клетки на шкалу.

ПРИМЕЧАНИЕ Для просмотра клеток на шкале установите сначала для детектора FSC напряжение ниже 400.

- Отрегулируйте FSC Threshold (Порог FSC), чтобы свести к минимуму посторонние данные.
 - Щелкните **Stop (Cтoп)**. Распечатайте копию рабочего списка.
- Сохраните настройки прибора, как параметры приложения лизирования с отмывкой. Нажмите правой кнопкой **Cytometer Settings (Настройки цитометра)** уровня эксперимента и выберите **Application Settings (Параметры приложения) > Save (Сохранить)**.
 - Введите имя для параметров приложения, например *4-2H-2V LW*.

ПРИМЕЧАНИЕ Рекомендуется использовать одинаковое имя при любом обновлении параметров приложения лизирования с отмывкой. Это приведет к перезаписи текущих параметров, что позволит предотвратить сомнения о том, какие параметры использовать.

- Установите компенсацию с помощью гранул BD™ Multicolor CompBeads (номер по каталогу 644204; см. *Руководство по эксплуатации гранул BD Multicolor CompBeads*).

Сброс целевых значений

Перед переходом на новую партию гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads сбросьте целевые значения с помощью текущей партии гранул и новой партии гранул. Программное обеспечение использует эту информацию для сброса целевых значений новой партии к тем же значениям PMTV, что используются для текущей партии.

ПРИМЕЧАНИЕ Убедитесь, что в текущей партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads имеется достаточное количество свободных гранул для сброса целевых значений при переходе на новую партию гранул (см. табл. 2). Если в текущей партии отсутствует необходимое количество гранул для сброса целевых показателей, необходимо определить новые базовые показатели, используя новую партию гранул.

Запустите компьютер, цитометр и программное обеспечение. Войдите в программное обеспечение BD FACSDiva как администратор.

Перед входом в систему загрузите файл новой партии гранул. См. Импорт файла партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads.

- В окне **Setup Control (Управление настройками)** выберите **Reset Target Values (Сброс целевых значений)** в меню **Characterize (Оценка)**.
- Установите флажок **Load Tube Manually (Загрузить пробирку вручную)**.
- Убедитесь, что идентификаторы партии гранул для настройки для старой (текущей) партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads и новой партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads являются правильными.

4. Убедитесь, что выбрана конфигурация цитометра 4-2H-2V.
5. Установите пробирку со старой (текущей) партией гранул в цитометр.
6. Щелкните **Run (Выполнить)**.

Откроется диалоговое окно Resetting Target Values (Сброс целевых значений).

7. При появлении запроса удалите пробирку со старой партией гранул и установите пробирку с новой партией гранул.
8. При появлении запроса удалите пробирку с новой партией гранул.

После завершения задачи откроется диалоговое окно, предлагающее просмотреть отчет Reset Target Values Report (Отчет о сбросе целевых значений).

9. Чтобы просмотреть отчет, щелкните **View Report (Просмотреть отчет)**. Чтобы распечатать его, выберите **File (Файл) > Print (Печать)**.
10. Для завершения сброса целевых показателей и возврата в окно Setup (Настройка) рабочей области щелкните **Finish (Готово)**.
11. Выберите **File (Файл) > Exit (Выйти)**.

Рабочая область CS&T закроется и снова откроется рабочая область BD FACSDiva.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

Просмотр отчета о характеристиках цитометра

Отчет о характеристиках цитометра содержит сведения о цитометре, партии гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads, параметрах детектора и лазера, спецификациях, параметрах цитометра из раздела параме-

тров детектора в отчете о характеристиках и результаты успешной или неуспешной проверки. Описания измерений, использованных для параметров детектора, представлены в табл. 4.

Таблица 4 Параметры детектора

Измерение	Описание
Лазер	Название лазера
Детектор	Детектор светорассеяния или флуоресценции
Параметр	Название флуорохрома (заданное)
Целевое значение	Целевое значение MFI, определяемое базовыми показателями
Фактическое целевое значение	Значение MFI, измеренное во время проверки характеристик
% отклонения целевого значения	Процентное отклонение между базовым целевым значением MFI и значением MFI, определенным во время проверки характеристик
Устойчивый CV ярких гранул в %	Устойчивый коэффициент вариации ярких гранул в процентах
Срединный канал средних гранул	Значение MFI средних гранул, используемое при расчете эффективности детектирования фотонов (Qg) и линейности
Устойчивый CV средних гранул в %	Устойчивый коэффициент вариации средних гранул в процентах, используемый при расчете эффективности детектирования фотонов (Qg)
Срединный канал темных гранул	Значение MFI темных гранул, используемое при расчете относительной оптической фоновой флуоресценции (Br) в детекторе
Устойчивый CV темных гранул в %	Устойчивый коэффициент вариации темных гранул в процентах, используемый при определении относительного оптического фона (Br) в детекторе
PMTV	Значение напряжения в трубке фотоэлектронного умножителя (PMT) в ходе текущей проверки характеристик
ΔPMTV	Отклонение между значениями напряжения PMT для базовых показателей и текущей проверки характеристик

Таблица 4 Параметры детектора

Измерение	Описание
Qr	Относительная эффективность детектирования флуоресценции, используемая для отслеживания эффективности улавливания света детектором
Bg	Относительный оптический фоновый сигнал, используемый для отслеживания уровней оптического фона в детекторе
P/F	Pass (Успешно) или Fail (Сбой): проверка характеристик цитометра является успешной, если разница между базовым значением PMT и текущим значением PMT составляет не более 50 вольт, мощность лазера и давление проточной жидкости находятся в пределах диапазона, а значение gCV ярких гранул в процентах в основных каналах (FITC, APC, V450) ниже 6 %

8. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Воспроизводимость настройки лизирования с отмывкой

Параметры приложения лизирования с отмывкой определяются с помощью 3 партий гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads в каждом из 4 отдельных проточных цитометров BD FACSCanto II. Целые клетки крови окрашиваются в трех экземплярах с конъюгированными флуорохромом одного цвета антителами и собираются с помощью параметров приложения лизирования с отмывкой на каждом цитометре.

Воспроизводимость определяется для значений MFI окрашенных популяций клеток в виде двух отдельных компонентов. Первый компонент (воспроизводимость между партиями) представлен в табл. 5.

Второй компонент (воспроизводимость между приборами) представлен в табл. 6.

Таблица 5 Воспроизводимость значений MFI (между партиями)

Параметр	Коэффициент вариации (%)
FITC	1,9
PE	1,2
PerCP-Cy5.5	4,8
PE-Cy7	1,6
APC	1,9
APC-H7	1,2
V450	1,1
V500	3,8

Таблица 6 Воспроизводимость значений MFI (между приборами)

Параметр	Коэффициент вариации (%)
FITC	8,7
PE	3,6
PerCP-Cy5.5	14,0
PE-Cy7	1,9
APC	4,4
APC-H7	3,1
V450	6,3
V500	3,7

Повторяемость проверок характеристик

Десять одинаковых проверок характеристик было выполнено для каждой из 3 партий гранул BD FACSDiva CS&T IVD Beads с помощью 3 отдельных проточных цитометров BD FACSCanto II. Значения %CV для %rCV ярких гранул и %CV для значений MFI ярких гранул были рассчитаны для каждого детектора. Внутрианалитическая сходимость (повторяемость между пробирками) представлена в табл. 7.

Таблица 7 Повторяемость проверок характеристик

Параметр	%CV для %rCV ярких гранул	%CV для MFI ярких гранул
FSC	15,5	0,33
SSC	9,6	0,52
FITC	5,3	0,48
PE	7,6	0,36
PerCP-Cy5.5	3,7	0,48
PE-Cy7	2,1	0,71
APC	2,2	0,48
APC-H7	3,2	0,45
V450	2,8	0,65
V500	3,1	0,68

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads предназначены для использования с программным обеспечением BD FACSDiva версии 7.0 или выше на проточном цитометре BD FACSCanto II с конфигурацией 4-2H-2V.

- Гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads не могут использоваться для калибровки флуоресценции и не должны использоваться для настройки проточного цитометра для количественных измерений флуоресценции.

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	Возможные причины	Решение
Гранулы не обнаружены	Гранулы не были смешаны перед разбавлением, гранулы слишком сильно разбавлены, примеси в суспензии гранул, используются неправильные гранулы	Поместите флакон с гранулами на вортекс, приготовьте свежую суспензию гранул и повторите обработку.
	Пузырьки воздуха в проточной кювете или фильтре проточной жидкости	Проверьте проточную систему на наличие пузырьков и примесей. Более подробно см. в Руководстве по эксплуатации цитометра.
	Засоры в пробирках с образцами и трубках	Проверьте проточную систему на наличие засоров и примесей. Более подробно см. в Руководстве по эксплуатации цитометра.
	Обратное давление в трубке для отходов	Проверьте выходное отверстие резервуара для отходов на наличие препятствий. Более подробно см. в Руководстве по эксплуатации цитометра.
	Высокий шум при светорассеянии (FSC или SSC)	Выполните ежемесячное техническое обслуживание. Более подробно см. в Руководстве по эксплуатации цитометра. Обратитесь в компанию BD Biosciences.

Проблема	Возможные причины	Решение
Проверка характеристик завершена с предупреждениями	Относительное изменение характеристик работы цитометра	Просмотрите отчет о характеристиках цитометра, чтобы определить, указывают ли предупреждения на риск для эксперимента при продолжении работы.
		Приготовьте свежую суспензию гранул и заново выполните проверку характеристик.
Сбой проверки характеристик	Отношение gCV темных к средним гранулам составляет менее 1,5	Выполните процедуру ежемесячной очистки. Более подробно см. в Руководстве по эксплуатации цитометра.
		Приготовьте свежую суспензию гранул и заново выполните проверку характеристик.
	Значения для измерений, используемых для проверки характеристик цитометра (см. табл. 4), находятся вне указанного диапазона	Выполните процедуру ежемесячной очистки. Более подробно см. в Руководстве по эксплуатации цитометра. Обратитесь в компанию BD Biosciences.

Для получения дополнительной поддержки при устранении неполадок обратитесь в службу научной поддержки BD Biosciences или к местному представителю BD Biosciences.



CD3 (SK7)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD3

Форма	№ по каталогу	Форма	№ по каталогу
FITC ^a	345763	PE-Cy7	341111
FITC ^b	345764	APC	345767
PE	345765	APC-Cy7	341110
PerCP	345766	APC-H7	641415
PerCP-Cy5.5	332771	V500-C	652896

- a. 50 тестов
b. 250 тестов

03/2018

23-13674-07



© 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 CD3 предназначен для диагностической идентификации in vitro клеток, экспрессирующих антиген CD3, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым ПО (таким как клиническое ПО BD CellQuestTM, BD CellQuestTM Pro, BD FACSDivaTM или BD FACSCantoTM) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя к цитометру.

Приложения

Экспрессия антигена CD3 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻³.

2. СОСТАВ

CD3, клон SK7, получен путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных человеческими тимocyтaми. CD3 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Все нижеперечисленные реагенты поставляются в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS), рецептура которого описана в табл. 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC (50 тестов)	100 мкг в 1,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	100
FITC (250 тестов)	500 мкг в 5,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	100
PE	25 мкг в 2,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	12,5

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц.^а (мкг/мл)
PerCP	25 мкг в 2,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	12,5
PerCP-Cy TM 5.5b	3 мкг в 1,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	3
PE-Cy TM 7	12,5 мкг в 0,5 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	25
APC	25 мкг в 0,5 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	50
APC-Cy7	12,5 мкг в 0,5 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	25
APC-H7	50 мкг в 0,5 мл PBS с BSA и ProClin TM 300 ^c	100
BD Horizon TM V500-C	25 мкг в 0,5 мл PBS с BSA и ProClin TM 950	50

a. Конц. = концентрация

b. CyTM — 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, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

c. ProClin является товарным знаком компании The Dow Chemical Company или ее аффилированных лиц.

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, APC-H7, V500-C: ≤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 с крышками
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Центрифуга
- Лизирующий раствор BD FACSTTM Lysing Solution (10X) (№ по каталогу 349202)

Инструкции по разбавлению и предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.

- BD CellWASHTM (№ по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- Буферный раствор для окрашивания, состоящий из PBS с 0,2 % бычьего сыроточного альбумина (BSA) и 0,1 % азида натрия

- BD CellFIX™ (№ по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида (PFA) в PBS с 0,1 % азида натрия

Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.

- Стабилизирующий фиксатив BD™ Stabilizing Fixative (3X) (№ по каталогу 339860)

Инструкции по разбавлению и предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.

- Гранулы BD Calibrite™ Beads

Информацию см. в разделе bdbiosciences.com.

- Семицветные настрочные гранулы BD FACSTM 7-color setup beads (№ по каталогу 335775)

- Гранулы BD™ Multicolor CompBeads (№ по каталогу 644204)

- Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads (№№ по каталогу 656046 и 656047)

- Проточный цитометр BD FACS

Подробности см. в руководстве пользователя цитометра.

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 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. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{6, 7} 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.

При расфасовке некоторых реагентов по флаконам используется консервант ProCln 300, и они содержат 0,003 % смеси CMIT/MIT (3:1), номер CAS: 55965-84-9.

	Предупреждение
	H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
	Надеть перчатки и средства защиты глаз. Надеть защитную одежду. Избегать вдыхания тумана / паров / вещества в распыленном состоянии. При раздражении кожи или сыпи: обратитесь к врачу. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды. Выполняйте утилизацию содержимого/контейнера с соблюдением мер предосторожности, описанных в местных/региональных/государственных/международных нормативных требованиях.

6. ПРОЦЕДУРА

Окраска образцов

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12 x 75 мм с крышкой добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD3.

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 в каждую пробирку.
4. Мягко встряхните пробирки на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте пробирки при 300 g в течение 5 минут.
6. Отделите супернатант аспирацией.
7. Добавьте 2 мл буфера в каждую пробирку в соответствии с используемым флуорохромом (табл. 2). «Да» в обоих столбцах означает, что можно использовать любой буфер.

Таблица 2. Рекомендуемый буфер

Флуорохром	Буфер окрашивания	BD CellWASH
FITC	Да	Да
PE	Да	Да
PerCP	Не проверялось	Да
PerCP-Cy5.5	Да	Да
PE-Cy7	Да	Да
APC	Да	Да

Таблица 2. Рекомендуемый буфер

Флуорохром	Буфер окрашивания	BD CellWASH
APC-Cy7	Не проверялось	Да
APC-H7	Да	Да
V500-C	Не проверялось	Да

8. Центрифугируйте пробирки при 300 g в течение 5 минут.
9. Отделите супернатант аспирацией.
10. Добавьте 0,5 мл буфера в каждую пробирку согласно табл. 2 и немедленно проанализируйте образцы или добавьте фиксатив согласно табл. 3.

Добавление фиксатива

1. Добавьте 0,5 мл фиксатива согласно табл. 3. «Да» в обоих столбцах означает, что можно использовать любой фиксатив.

ВНИМАНИЕ! Для многоцветного анализа с применением PE-конъюгата используйте BD CellFIX или 1%-й раствор параформальдегида.

Таблица 3. Совместимый фиксатив

Флуорохром	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентрированный стабилизирующий фиксатив BD Stabilizing Fixative
FITC	Да	Нет
PE	Да	Нет
PerCP	Да	Нет
PerCP-Cy5.5	Да	Нет
PE-Cy7	Да	Да
APC	Да	Нет
APC-Cy7	Да	Да

Таблица 3. Совместимый фиксатив

Флуорохром	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентри- рованный ста- билизирую- щий фиксатив BD Stabilizing Fixative
APC-H7	Да	Да
V500-C	Да	Нет

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе».
3. Инкубируйте пробирки при 2–8 °C в темноте согласно табл. 4.

Таблица 4. Рекомендуемая процедура инкубации

	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентри- рованный ста- билизирую- щий фиксатив BD Stabilizing Fixative
Период инкубации	60 минут	30 минут
Дополнительные этапы	1. Центрифугируйте пробирку при 300 g в течение 5 минут. 2. Отделите супернатант аспирацией. 3. В каждую пробирку добавьте 0,5 мл буфера окрашивания и аккуратно перемешайте на «вортексе».	Нет

4. Тщательно перемешайте содержимое пробирок перед анализом.

До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Не храните PE-конъюгаты в стабилизирующем фиксативе BD Stabilizing Fixative, так как это может вызвать уменьшение интенсивности окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Длительное воздействие параформальдегида на клетки может привести к повышенной автофлуоресценции в фиолетовых каналах. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты APC-Cy7 и в меньшей степени — конъюгаты PE-Cy7 и APC-H7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида или света. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

Аналитические результаты

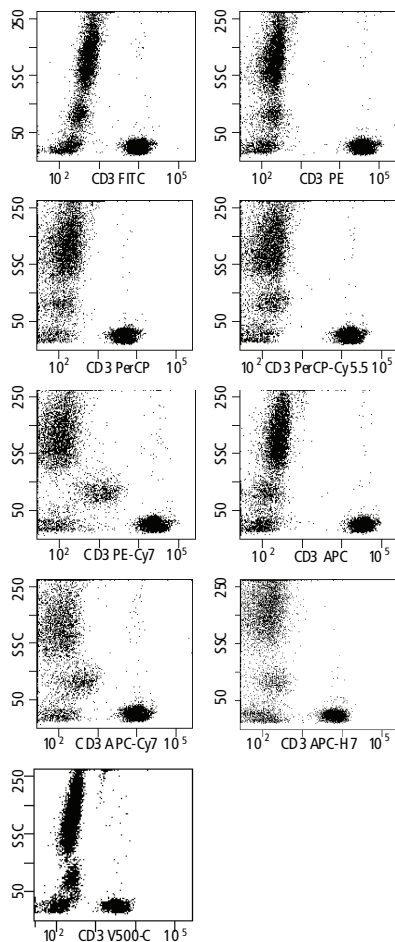
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр⁸. 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 в покое. Лазерное возбуждение проводилось при длине волны 405, 488 и 635 нм.

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



Внутренний контроль качества

Настройка цитометра зависит от используемого флуорохрома и типа цитометра.

Данные о методах настройки, пригодных для цитометра и специфически меченого флуорохрома, см. в табл. 5. Методы настройки приведены после табл. 5.

Таблица 5. Метод настройки, рекомендуемый для сочетаний цитометра и флуорохрома

Флуорохром	BD FACS Canto II	BD FAC S Canto	BD FACS Calibur
FITC	1, 2, 4	2	3
PE	1, 2, 4	2	3
PerCP	2	2	3
PerCP-Cy5.5	1, 2, 4	2	3
PE-Cy7	1, 2, 4	2	Н/Д
APC	1, 2, 4	2	3
APC-Cy7	2, 4	2	Н/Д
APC-H7	1, 4	2	Н/Д
V500-C	4	Н/Д	Н/Д

Метод настройки 1

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-H7.

1. Используйте семицветные настроенные гранулы BD FACS 7-color setup beads и клиническое ПО BD FACSCanto для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.

2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмывкой из клинического программного обеспечения BD FACSCanto с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva версии 7.0.

Подробнее см. *Справочное руководство по программному обеспечению BD FACSDiva™ версии 7.0.*

3. Выберите **Overwrite** (Перезаписать) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), чтобы связать значения напряжения ФЭУ.

При этом название параметра изменится с **APC-H7** на **APC-Cy7**. Несовпадающие параметры будут удалены.

ВНИМАНИЕ! Если выбрать **Apply** (Применить) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), напряжение ФЭУ для APC-Cy7 не будет связано с параметрами приложения лизирования с отмывкой и текущие настройки напряжения ФЭУ и название параметра не изменятся.

4. Запишите значение напряжения ФЭУ для параметра APC-Cy7, отмените связь с параметрами приложения лизирования с отмывкой и измените метку параметра **APC-Cy7** на **APC-H7**.
5. Введите значение напряжения ФЭУ для APC-Cy7, записанное для параметра APC-H7.
6. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и программное обеспечение BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство по эксплуатации гранул **BD™ Multicolor CompBeads**.

Метод настройки 2

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-Cy7.

1. Используйте семицветные настроечные гранулы BD FACS 7-color setup beads и клиническое ПО BD FACSCanto для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.
2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмывкой из клинического программного обеспечения BD FACSCanto с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva.
3. Выберите **Overwrite** (Перезаписать) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), чтобы связать значения напряжения ФЭУ и настройки компенсации для всех параметров. Несовпадающие параметры будут удалены.

ПРИМЕЧАНИЕ. В случае использования лазерной конфигурации 4-2H-2V (конфигурации BD по умолчанию), при выборе **Overwrite** (Перезаписать) название параметра изменится с **APC-H7** на **APC-Cy7**.

ВНИМАНИЕ! При выборе **Apply** (Применить) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра) связаны будут только настройки для параметров, совпадающие с приложением лизирования с отмывкой. При использовании лазерной конфигурации 4-2H-2V и выборе **Apply** (Применить) значения

напряжения ФЭУ и настройки компенсации для APC-Cy7 связаны не будут. Название параметра останется **APC-H7**.

Метод настройки 3

Используйте гранулы BD Calibrite Beads и клиническое ПО BD FACSComp™ для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.

Метод настройки 4

Рекомендуется при использовании 8-цветного сочетания реагентов, которое включает фиолетовые флуорохромы.

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads и программное обеспечение BD FACSDiva версии 7.0 для настройки значений напряжения ФЭУ. Подробнее см. руководство по эксплуатации BD FACSDiva CS&T IVD Beads.
2. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и программное обеспечение BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство пользователя цитометра и руководства по эксплуатации.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек цитометра и для проверки системы управления качеством⁹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD3 реагирует с эпсилон-цепью комплекса антиген CD3 / Т-клеточный рецептор для распознавания антигенов (TCR)¹. Данный комплекс состоит не менее чем из шести белков молекулярной массой от 20 до 30 килодальтон (кДа)¹⁰. Антиген, распознаваемый антителами CD3, нековалентно связывается с Т-клеточным рецептором α/β или γ/δ (70–90 кДа)¹¹.

Антиген CD3 присутствует на 61–85 % нормальных лимфоцитов периферической крови¹².

Чувствительность

Чувствительность определяется как степень разделения популяций CD3⁺ и CD3[–]. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Разделение CD3⁺ и CD3[–] определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD3⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD3 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 оценили клон SK7 в составе слепой панели антител и представили хорошо согласующиеся между собой результаты^{13–16}.

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. 6. 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 6. Повторяемость MFI Т-клеток по разным партиям и многим донорам (N)^a (N)

Флуорохром	N ^b	Средняя MFI	Объединенное SD ^c	Объединенный %CV ^d
FITC ^e (50 тестов)	19	295,1	27,18	9,21
FITC ^f (250 тестов)	5	410,7	47,0	11,44
PE	16	1900,5	148,51	7,81
PerCP	23	257,6	24,21	9,40
PerCP-Cy5.5	5	1656,9	122,62	7,4
PE-Cy7	4	3742,3	548,37	14,65
APC	3	2136,8	201,57	9,43
APC-Cy7	4	1256,3	96,13	7,65
APC-H7 ^f	64	5172,2	71,34	1,38
V500-C ^f	64	6098,4	54,2	0,9

- За исключением APC-H7 и V500-C, которые тестировались с одной партией контроля BD™ Multi-Check.
- N = количество образцов
- SD = среднеквадратичное отклонение
- CV = коэффициент вариации
- Значения реагентов флуорохром/белок не совпадали для разных партий, как и данные, полученные для одного образца или параметров настройки.
- Данные собраны как средняя интенсивность флуоресценции.

Погрешность

Данные о погрешности были собраны на проточном цитометре BD FACScan™ с использованием программного обеспечения BD Simulset™ для определения CD3/CD4 Т-лимфоцитов — хелперов/индукторов. Результаты для реагента BD Simulset™ Lymphocyte CD3/CD4 сравнили с результатами для реагента BD Simulset™ IMK Plus CD4/CD8. См. табл. 7.

Таблица 7. Перрессионный анализ реагента BD Simulset Lymphocyte CD3/CD4 и панели реагентов BD Simulset IMK Plus

Флуорохром	N ^a	г	Коэффициент	Свободный член	Диапазон b (%)
CD3/CD4	84	0,96	0,95	-0,27	8–68

a. N = количество образцов

b. Объединенный диапазон реагента BD Simulset Lymphocyte и реагента BD Simulset IMK Plus.

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Только для диагностики in vitro.
- Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP и V500-C). 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 обычно собирают 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 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 антигенов.
	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 цитометра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.

- Ginaldi L, Matutes E, Farahat N, De Martinis M, Morilla R, Catovsky D. Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies: a quantitative study by flow cytometry. *Br J Haematol*. 1996;93:921-927.
- Ortaldo JR, Winkler-Pickett RT, Yagita H, Young HA. Comparative studies of CD3⁺ and CD3⁺ CD56⁺ cells: examination of morphology, functions, T cell receptor rearrangement, and pore-forming protein expression. *Cell Immunol*. 1991;136:486-495.
- 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*; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. H42-A2.
- Brenner MB, Groh V, Porcelli SA, et al. Structure and distribution of the human $\gamma\delta$ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
- Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-662.
- Reichert T, DeBruyère M, Deney V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.

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 cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.
14. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti-Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
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*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
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*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.



CD19 (SJ25C1)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD19

Форма	№ по каталогу
FITC	345788
PE	345789
PerCP	345790
PerCP-Cy5.5	332780
PE-Cy7	341113
APC	345791
APC-Cy7	348814

03/2018

23-13675-04



© 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 CD19 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* клеток, экспрессирующих антиген CD19, 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 LYSYST™ II) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя прибора.

Приложения

Экспрессия CD19 в исследовании гематологической неоплазии¹

2. СОСТАВ

CD19, клон SJ25C1, получен путем гибридизации клеток миеломы Sp2/0 мышей с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками NALM1 + NALM16. CD19 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 табл. 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC	6 мкг в 1,0 мл PBS	6
PE	12,5 мкг в 1,0 мл PBS	12,5
PerCP	12,5 мкг в 1,0 мл PBS	12,5
PerCP-Cy5.5 ^b	5 мкг в 1,0 мл PBS	5
PE-Cy7 TM	12,5 мкг в 0,5 мл PBS	25
APC	25 мкг в 0,5 мл PBS	50
APC-Cy7	25 мкг в 0,5 мл PBS	50

- 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, 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, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, 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 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 промыочный 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 °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^{2,3}.

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

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

жизнеспособность образцов и установить предельное значение. Рекомендуемое предельное значение — не менее 80 % жизнеспособных клеток².

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{4, 5} 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 CD19. 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.

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

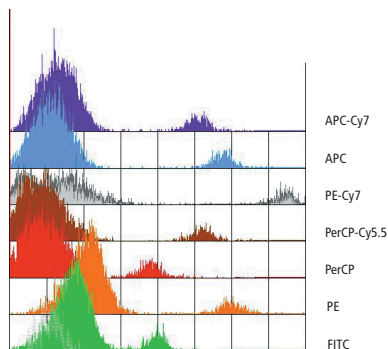
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр⁶. Соберите и проанализируйте данные в списочном режиме с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем собирать данные, отрегулируйте пороговый уровень, чтобы минимизировать учет клеточ-

ных обломков и убедиться, что интересующая вас популяция присутствует. На рис. 1 представлены репрезентативные данные, полученные на периферической 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 системы⁷.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Реагент CD19 (SJ25C1) распознает антиген В-лимфоцитов человека молекулярной массой 90 килодальтон (кДа)^{8, 9}.

Антиген CD19 присутствует на приблизительно 7–23 % лимфоцитов периферической крови человека¹⁰ и на спленоцитах¹¹. CD19 реагирует с зонами В-лимфоцитов нормальных миндалин и лимфатических узлов¹². Антиген CD19 присутствует на В-лимфоцитах человека любой степени зрелости, но отсутствует на окончательно дифференцированных плазматических клетках¹². CD19 не реагирует с покоящимися или активированными Т-лимфоцитами, гранулоцитами и моноцитами¹³.

Чувствительность

Чувствительность определяется как степень разделения популяций CD19⁺ и CD19⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на лизированной цельной крови. Разделение CD19⁺ и CD19⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD19⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD19 был представлен на рассмотрении на Второй международной научно-практической конференции по дифференцированным антигенам лейкоцитов человека (Second International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон SJ25C1 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты⁹.

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 В-лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

	№	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^a
FITC	13	55,1	10,39	18,86
PE	18	631,0	115,87	18,36
PerCP	25	86,9	10,03	11,54
PerCP-Cy5.5	7	492,57	20,05	4,07
PE-Cy7	3	1006,0	35,27	3,52
APC	3	639,0	169,17	26,48
APC-Cy7	3	180,52	1,59	0,88

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. Особо рекомендуется многоцветный анализ с использованием сочетаний реагентов³.

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.

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.
	Ненадлежащие 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.
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. Cabezudo E, Carrara P, Morilla R, Matutes E. Quantitative analysis of CD79b, CD5 and CD19 in mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica*. 1999;84:413-418.
2. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
3. 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.
4. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition*; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
5. 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.
6. 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.
7. *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.
8. Moldenhauer G, Dörken B, Schwartz R, Pezzutto A, Knops J, Hammerling GJ. Analysis of ten B lymphocyte-specific workshop monoclonal antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:61-67.
9. Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:3-43.
10. Reichert T, DeBruyère M, Deney V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.

11. Tedder T, Zhou L-J, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15:437-442.
12. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
13. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B-lymphocyte development. *Blood*. 1987;70:1316-1324.



CD20 (L27)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD20

Форма	№ по каталогу	Форма	№ по каталогу
FITC	345792	APC	340908
PE	345793	APC-Cy7	335829
PerCP	345794	APC-H7	641414
PerCP-Cy5.5	332781	V450	655872
PE-Cy7	335828		

02/2019

23-13676-06



© 2019 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 CD20 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* (IVD) клеток, экспрессирующих антиген на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым ПО (таким как клиническое ПО BD CellQuest™, BD CellQuest™ Pro, BD FACSDiva™ или BD FACSCanto™) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя к цитометру.

Приложения

Экспрессия антигена CD20 в исследовании гематологической неоплазии¹.

2. СОСТАВ

CD20, клон L27, получен гибридизацией клеток миеломы Sp2/0 мышей с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных лимфобластоидными клетками штамма LB. CD20 состоит из мышинных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Каждый из нижеприведенных реагентов поставляется в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер (PBS), а также желатин и 0,1 % азида натрия. Концентрации приведены в табл. 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC	100 мкг в 2,0 мл PBS	50
PE	25 мкг в 1,0 мл PBS	25
PerCP	50 мкг в 2,0 мл PBS	25
PerCP-Cy™5.5 ^b	10 мкг в 1,0 мл PBS	10
PE-Cy™7	50 мкг в 0,5 мл PBS	100

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
APC	20 мкг в 0,5 мл PBS	40
APC-Cy7	25 мкг в 0,5 мл PBS	50
APC-H7	50 мкг в 0,5 мл PBS	100
BD Horizon™ V450	50 мкг в 0,5 мл PBS	100

а. Конц. = концентрация

б. 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, 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, APC-Cy7, APC-H7, V450: ≤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 с крышками
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Центрифуга
- Лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (10X) (№ по каталогу 349202).

Инструкции по разбавлению и предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.

- BD CellWASH™ (№ по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- Буферный раствор для окрашивания, состоящий из PBS с 0,2 % бычьего сыроточного альбумина (BSA) и 0,1 % азида натрия
- BD CellFIX™ (№ по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида (PFA) в PBS с 0,1 % азида натрия

Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.

- Стабилизирующий фиксатив BD™ Stabilizing Fixative (3X) (№ по каталогу 339860)

Инструкции по разбавлению и предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.

- Гранулы BD Calibrite™ Beads
Информацию см. в разделе bdbiosciences.com.
- Семицветные настроечные гранулы BD FACSTM 7-color setup beads (№ по каталогу 335775)
- Гранулы BD™ Multicolor CompBeads (№ по каталогу 644204)
- Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads (№№ по каталогу 656046 и 656047)
- Проточный цитометр BD FACS
Подробности см. в руководстве пользователя цитометра.

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^{2,3}.

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 клеток².

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными

источниками инфекции^{4,5} 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

Окрашивание образцов

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12 x 75 мм с крышкой добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD20.
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 в каждую пробирку.
4. Мягко встряхните пробирки на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте пробирки при 300 g в течение 5 минут.
6. Отделите супернатант аспирацией.

- Добавьте 2 мл буфера в каждую пробирку в соответствии с используемым флуорохромом (табл. 2). «Да» в обоих столбцах означает, что можно использовать любой буфер.

Таблица 2. Рекомендуемый буфер

Флуорохром	Буфер окрашивания	BD CellWASH
FITC	Да	Да
PE	Да	Да
PerCP	Не проверялось	Да
PerCP-Cy5.5	Да	Да
PE-Cy7	Да	Да
APC	Да	Да
APC-Cy7	Не проверялось	Да
APC-H7	Да	Да
V450	Не проверялось	Да

- Центрифугируйте пробирки при 300 g в течение 5 минут.
- Отделите супернатант аспирацией.
- Добавьте 0,5 мл буфера в каждую пробирку согласно табл. 2 и немедленно проанализируйте образцы или добавьте фиксатив согласно табл. 3.

Добавление фиксатива

- Добавьте 0,5 мл фиксатива согласно табл. 3. «Да» в обоих столбцах означает, что можно использовать любой фиксатив.

ВНИМАНИЕ! Для многоцветного анализа с применением PE-конъюгата используйте BD CellFIX или 1%-й раствор параформальдегида.

Таблица 3. Совместимый фиксатив

Флуорохром	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентрированный стабилизирующий фиксатив BD Stabilizing Fixative
FITC	Да	Нет
PE	Да	Нет
PerCP	Да	Нет
PerCP-Cy5.5	Да	Нет
PE-Cy7	Да	Да
APC	Да	Нет
APC-Cy7	Да	Да
APC-H7	Да	Да
V450	Да	Нет

- Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе».

3. Инкубируйте пробирки при 2–8 °C в темноте согласно табл. 4.

Таблица 4. Рекомендуемая процедура инкубации

	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентри- рованный ста- билизирую- щий фиксатив BD Stabilizing Fixative
Период инкуба- ции	60 минут	30 минут
Дополнитель- ные этапы	1. Центрифугируйте пробирки при 300 g в течение 5 минут. 2. Отделите супернатант аспирацией. 3. В каждую пробирку добавьте 0,5 мл буфера окрашивания и аккуратно перемешайте на «вортексе».	Нет

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты APC-Cy7 и в меньшей степени — конъюгаты PE-Cy7 и APC-H7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида или света.

Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

ВНИМАНИЕ! Не храните PE-конъюгаты в стабилизирующем фиксативе BD Stabilizing Fixative, так как это может вызвать уменьшение интенсивности окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Длительное воздействие параформальдегида на клетки может привести к повышенной автофлуоресценции в фиолетовых каналах.

4. Тщательно перемешайте содержимое пробирок перед анализом.

До анализа храните пробирки при 2–8 °C. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

Аналитические результаты

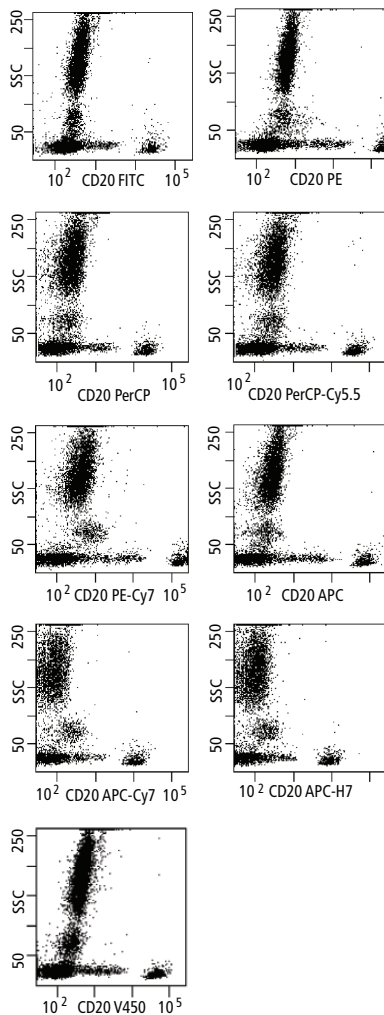
При некоторых заболеваниях можно ожидать аномального числа клеток, экспрессирующих данный антиген, или aberrантного уровня его экспрессии. Для проведения надлежащего анализа важно понимать картину нормальной экспрессии данного антигена и ее связь с экспрессией других антигенов.

Проточная цитометрия

Тщательно встряхните клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед их введением в проточный цитометр⁶. 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 лейкоцитах периферической крови и гейтированные по лимфоцитам. Лазерное возбуждение проводилось при длине волны 405, 488 и 635 нм.

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



Внутренний контроль качества

Настройка цитометра зависит от используемого флуорохрома и типа цитометра.

Данные о методах настройки, пригодных для цитометра и специфически меченого флуорохрома, см. в табл. 5. Методы настройки приведены после табл. 5.

Таблица 5. Метод настройки, рекомендуемый для сочетаний цитометра и флуорохрома

Флуоро-хром	BD FACS Canto II	BD FACS Canto	BD FACS Calibur
FITC	1, 2, 4	2	3
PE	1, 2, 4	2	3
PerCP	2	2	3
PerCP-Cy5.5	1, 2, 4	2	3
PE-Cy7	1, 2, 4	2	Н/Д
APC	1, 2, 4	2	3
APC-Cy7	2, 4	2	Н/Д
APC-H7	1, 4	2	Н/Д
V450	4	Н/Д	Н/Д

Метод настройки 1

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-H7.

1. Используйте семицветные настроенные гранулы BD FACS 7-color setup beads и клиническое ПО BD FACSCanto для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.

2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмывкой из программного обеспечения BD FACSCanto clinical software с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva версии 7.0 или более поздней.

Подробнее см. Справочное руководство по программному обеспечению BD FACSDiva™ версии 7.0.

3. Выберите **Overwrite** (Перезаписать) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), чтобы связать значения напряжения ФЭУ.

При этом название параметра изменится с **APC-H7** на **APC-Cy7**. Несовпадающие параметры будут удалены.

ВНИМАНИЕ! Если выбрать **Apply** (Применить) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), напряжение ФЭУ для APC-Cy7 не будет связано с параметрами приложения лизирования с отмывкой и текущие настройки напряжения ФЭУ и название параметра не изменятся.

4. Запишите значение напряжения ФЭУ для параметра APC-Cy7, отмените связь с параметрами приложения лизирования с отмывкой и измените метку параметра **APC-Cy7** на **APC-H7**.
5. Введите значение напряжения ФЭУ для APC-Cy7, записанное для параметра APC-H7.
6. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и ПО BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство по эксплуатации гранул *BD™ Multicolor CompBeads*.

Метод настройки 2

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-Cy7.

1. Используйте семицветные настроечные гранулы BD FACS 7-color setup beads и клиническое ПО BD FACSCanto для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.
2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмывкой из клинического программного обеспечения BD FACSCanto с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva.
3. Выберите **Overwrite** (Перезаписать) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), чтобы связать значения напряжения ФЭУ и настройки компенсации для всех параметров. Несовпадающие параметры будут удалены.

ПРИМЕЧАНИЕ. В случае использования лазерной конфигурации 4-2Н-2V (конфигурации BD по умолчанию), при выборе **Overwrite** (Перезаписать) название параметра изменится с **APC-H7** на **APC-Cy7**.

ВНИМАНИЕ! При выборе **Apply** (Применить) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра) связаны будут только настройки для параметров, совпадающие с приложением лизирования с отмывкой. При использовании лазерной конфигурации 4-2Н-2V и выборе **Apply** (Применить) зна-

чения напряжения ФЭУ и настройки компенсации для APC-Cy7 связаны не будут. Название параметра останется **APC-H7**.

Метод настройки 3

Используйте гранулы BD Calibrite Beads и клиническое ПО BD FACSComp™ для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.

Метод настройки 4

Рекомендуется при использовании 8-цветного сочетания реагентов, которое включает фиолетовые флуорохромы.

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads и программное обеспечение BD FACSDiva версии 7.0 или более поздней для настройки значений напряжения ФЭУ. Подробнее см. руководство по эксплуатации BD FACSDiva CS&T IVD Beads.
2. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и ПО BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство пользователя цитометра и руководства по эксплуатации.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек цитометра и для проверки системы управления качеством.⁷

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Антиген CD20 — это фосфопротеин с молекулярным весом 35 или 37 килодальтон (кДа), в зависимости от степени фосфорилирования⁸. Антиген не гликозилирован⁸.

Антиген CD20 экспрессируется на В-лимфоцитах синхронно с экспрессией поверхностного IgM^{8,9}. Антиген присутствует на покоящихся и активированных В-лимфоцитах, но исчезает перед дифференцировкой в плазматические клетки.⁸ Антиген CD20 найден в зоне мантии и в герминально-центральных областях вторичных фолликулов лимфоидной ткани и может экспрессироваться на фолликулярных дендритных клетках (FDC) в герминальных центрах⁸. Низкоуровневая экспрессия антигена CD20 обнаружена в субпопуляции Т-лимфоцитов¹⁰.

Чувствительность

Чувствительность определяется как степень разделения популяций CD20⁺ и CD20⁻. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на клетках цельной крови. Разделение CD20⁺ и CD20⁻ определяли для каждого образца и усредняли по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при разделении клеток CD20⁺ и соответствующих отрицательных. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD20 был представлен на рассмотрение на Третьей международной научно-практической конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (Third International Workshop and Conference on Human Leucocyte

Differentiation Antigens). Участвовавшие лаборатории оценивали клон L27 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты¹¹.

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. 6. 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 6. Повторяемость MFI В-лимфоцитов по разным партиям и многим донорам (N)

Флуоро-хром	№	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^b
FITC	8	520,2	58,46	11,24
PE	3	2773,9	304,98	10,99
PerCP	28	542,0	51,84	9,57
PerCP-Cy5.5	5	2055,9	418,67	20,37
PE-Cy7	4	2181,5	192,15	8,81
APC	3	4063,5	1368,09	33,67
APC-Cy7	4	1205,3	137,41	11,40
APC-H7 ^c	64	9639,3	315,77	3,28
V450 ^c	64	26 746,7	480,6	1,8

a. N = количество образцов

b. CV = коэффициент вариации

c. Данные собраны как средняя интенсивность флуоресценции.

Погрешность

Данные погрешности собирали на проточных цитометрах BD FACScan™ и BD FACSCalibur™ с использованием ПО BD CellQuest версии 3.1 или более поздней для определения лимфоцитов CD20⁺. Результаты по реагенту CD20 PerCP-Cy5.5 сравнивали с результатами по реагенту CD20 PE. См. табл. 7.

Таблица 7. Регрессионный анализ по реагенту CD20 PerCP-Cy5.5 против реагента CD20 PE

Fluor ^a	N ^b	r	Коеф-фици-ент	Свобод-ный член	Диапа-зон (%)
CD20	53	0,97	0,91	-0,01	3,2–29,4

a. Fluor = флуорохром

b. N = количество образцов

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Только для диагностики in vitro.
- 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 реагентов.³

- 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 обычно собирают 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 ненарушения патентов. Искключительная 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 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 аزيد натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте аزيد натрия.
Мало или нет клеток	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность цитометра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marti GE, Faguet G, Bertin P, et al. CD20 and CD5 expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Ann NY Acad Sci.* 1992;651:480-483.

2. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
3. 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.
4. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition;* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. M29-A3.
5. 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.
6. 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.
7. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. H42-A2.
8. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD20. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:46-48.
9. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B-lymphocyte development. *Blood.* 1987;70:1316-1324.
10. Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (Pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry.* 1993;14:196-204.
11. Ling NR, MacLennan ICM, Mason DY. B-cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1987:302-335.



CD45 (2D1)

Моноклональные антитела мыши к сыворотке человека для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD45

Форма	№ по каталогу
FITC	345808
PerCP	345809
PerCP-Cy5.5	332784
APC	340910
APC-Cy7	348815
APC-H7	641417
V500-C	655873

03/2018

23-13678-07



© 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 CD20 предназначен для диагностической идентификации *in vitro* (IVD) клеток, экспрессирующих антиген CD20, на проточном цитометре BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть оборудован для обнаружения светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также необходимым ПО (таким как клиническое ПО BD CellQuestTM, BD CellQuestTM Pro, BD FACSDivaTM или BD FACSCantoTM) для сбора данных и их анализа. Инструкции см. в руководстве пользователя цитометра.

Приложения

Экспрессия антигена CD45 в исследовании гематологической неоплазии¹⁻⁶.

2. СОСТАВ

CD45, клон 2D1, получается путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных одноядерными клетками периферической крови человека (PBMC). CD45 состоит из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей.

Все нижеперечисленные реагенты поставляются в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS), рецептура которого описана в табл. 1.

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^a (мкг/мл)
FITC	100 мкг в 2,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	50
PerCP	50 мкг в 2,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	25
PerCP-Cy TM 5.5 ^b	6 мкг в 1,0 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	6

Таблица 1. Концентрации во флаконах

Форма	Поставляемое количество	Конц. ^а (мкг/мл)
APC	12,5 мкг в 0,5 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	25
APC-Су TM 7	50 мкг в 0,5 мл PBS с желатином и 0,1 % азида натрия	100
APC-H7	50 мкг в 0,5 мл PBS с BSA и ProCln TM 300 ^c	100
BD Horizon TM V500-C	50 мкг в 0,5 мл PBS с BSA и ProCln TM 950	100

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 BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, и заплаченные за него деньги будут возвращены.

c. ProCln является товарным знаком компании The Dow Chemical Company или ее аффилированных лиц.

Чистота антител следующая:

- FITC: ≤5 % свободного флуорофора во флаконах, измеренного методом эксклюзионной хроматографии (SEC)
- PerCP, PerCP-Cy5.5, APC, APC-Cy7, APC-H7, V500-C: ≤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 с крышками
- Микропипетка с наконечниками
- Мешалка «вортекс»
- Центрифуга
- Лизирующий раствор BD FACSTM Lysing Solution (10X) (№ по каталогу 349202)

Инструкции по разбавлению и предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.

- BD CellWASHTM (№ по каталогу 349524) или промывочный буфер PBS, содержащий 0,1 % азида натрия
- Буферный раствор для окрашивания, состоящий из PBS с 0,2 % бычьего сыровоточного альбумина (BSA) и 0,1 % азида натрия
- BD CellFIXTM (№ по каталогу 340181) или 1%-й раствор параформальдегида (PFA) в PBS с 0,1 % азида натрия

Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.

- Стабилизирующий фиксатив BDTM Stabilizing Fixative (3X) (№ по каталогу 339860)

Инструкции по разбавлению и предосторожности см. в руководстве по использованию реагентов.

- Гранулы BD CalibriteTM Beads

- Семцветные настроечные гранулы BD FACSTM 7-color setup beads (№ по каталогу 335775)
 - Гранулы BD™ Multicolor CompBeads (№ по каталогу 644204)
 - Гранулы BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads (№№ по каталогу 656046 и 656047)
 - Проточный цитометр BD FACS
- Подробности см. в руководстве пользователя цитометра.

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}.

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 клеток⁶.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращаясь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{8, 9} 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.

При расфасовке некоторых реагентов по флаконам используется консервант ProClin 300, и они содержат 0,003 % смеси CMIT/MIT (3:1), номер CAS: 55965-84-9.

	Предупреждение
	H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
	Надеть перчатки и средства защиты глаз. Надеть защитную одежду. Избегать вдыхания тумана / паров / вещества в распыленном состоянии. При раздражении кожи или сыпи: обратитесь к врачу. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды. Выполняйте утилизацию содержимого/контейнера с соблюдением мер предосторожности, описанных в местных/региональных/государственных/международных нормативных требованиях.

6. ПРОЦЕДУРА

Окрашивание образцов

1. К 100 мкл цельной крови в полистирольной пробирке 12 x 75 мм с крышкой добавьте соответствующий объем конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител CD45.
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 в каждую пробирку.

4. Мягко встряхните пробирки на «вортексе» и инкубируйте в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте пробирки при 300 g в течение 5 минут.
6. Отделите супернатант аспирацией.
7. Добавьте 2 мл буфера в каждую пробирку в соответствии с используемым флуорохромом (табл. 2). «Да» в обоих столбцах означает, что можно использовать любой буфер.

Таблица 2. Рекомендуемый буфер

Флуорохром	Буфер окрашивания	BD CellWASH
FITC	Да	Да
PerCP	Не проверялось	Да
PerCP-Cy5.5	Да	Да
APC	Да	Да
APC-Cy7	Не проверялось	Да
APC-H7	Да	Да
V500-C	Не проверялось	Да

8. Центрифугируйте пробирки при 300 g в течение 5 минут.
9. Отделите супернатант аспирацией.
10. Добавьте 0,5 мл буфера в каждую пробирку согласно табл. 2 и немедленно проанализируйте образцы или добавьте фиксатив согласно табл. 3.

Добавление фиксатива

1. Добавьте 0,5 мл фиксатива согласно табл. 3. «Да» в обоих столбцах означает, что можно использовать любой фиксатив.

ВНИМАНИЕ! Для многоцветного анализа с применением PE-конъюгата используйте раствор BD CellFIX или 1%-й раствор параформальдегида.

Таблица 3. Совместимый фиксатив

Флуорохром	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентрированный стабилизирующий фиксатив BD Stabilizing Fixative
FITC	Да	Нет
PerCP	Да	Нет
PerCP-Cy5.5	Да	Нет
APC	Да	Нет
APC-Cy7	Да	Да
APC-H7	Да	Да
V500-C	Да	Нет

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок на «вортексе».

3. Инкубируйте пробирки при 2–8 °С в темноте согласно табл. 4.

Таблица 4. Рекомендуемая процедура инкубации

	Раствор BD CellFIX (или 1 % PFA)	Неконцентри- рованный ста- билизирую- щий фиксатив BD Stabilizing Fixative
Период инкуба- ции	60 минут	30 минут
Дополнитель- ные этапы	1. Центрифугируйте пробирки при 300 g в течение 5 минут. 2. Отделите супернатант аспирацией. 3. В каждую пробирку добавьте 0,5 мл буфера окрашивания и аккуратно перемешайте на «вортексе».	Нет

4. Тщательно перемешайте содержимое пробирок перед анализом.

До анализа храните пробирки при 2–8 °С. Рекомендуется анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Не храните PE-конъюгаты в стабилизирующем фиксативе BD Stabilizing Fixative, так как это может вызвать уменьшение интенсивности окрашивания.

ВНИМАНИЕ! Длительное воздействие параформальдегида на клетки может привести к повышенной автофлуоресценции в фиолетовых каналах.

Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

ВНИМАНИЕ! Некоторые конъюгаты APC-Cy7 и в меньшей степени — конъюгаты APC-H7 обнаруживают изменения в своих эмиссионных спектрах при длительном воздействии параформальдегида или света. Для хранения окрашенных клеток в течение ночи промойте и ресуспендируйте их в буфере без параформальдегида после 1-часовой фиксации.

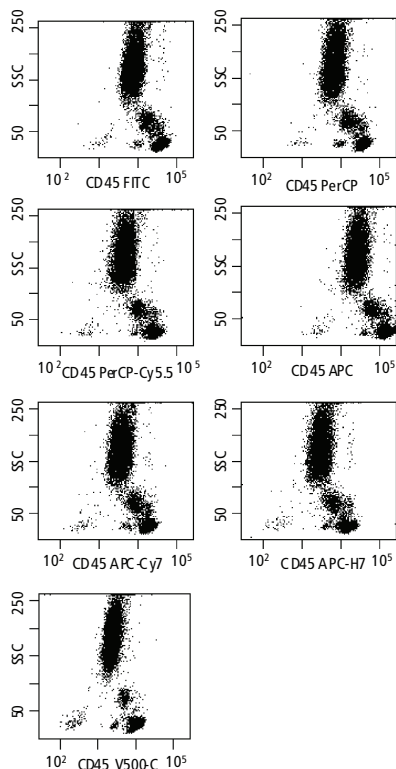
Аналитические результаты

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 цитометр¹⁰. 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 лейкоцитах периферической крови. Лазерное возбуждение проводилось при длине волны 405, 488 и 635 нм.

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



Внутренний контроль качества

Настройка цитометра зависит от используемого флуорохрома и типа цитометра.

Данные о методах настройки, пригодных для цитометра и специфически меченого флуорохрома, см. в табл. 5. Методы настройки приведены после табл. 5.

Таблица 5. Метод настройки, рекомендуемый для сочетаний цитометра и флуорохрома

Флуорохром	BD FACS Canto II	BD FACS Canto	BD FACS Calibur
FITC	1, 2, 4	2	3
PerCP	2	2	3
PerCP-Cy5.5	1, 2, 4	2	3
APC	1, 2, 4	2	3
APC-Cy7	2, 4	2	Н/Д
APC-H7	1, 4	2	Н/Д
V500-C	4	Н/Д	Н/Д

Метод настройки 1

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-H7.

1. Используйте семицветные настроенные гранулы BD FACS 7-color setup beads и клиническое ПО BD FACSCanto для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотозлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.
2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмывкой из клинического программного обеспечения BD FACSCanto с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva версии 7.0.

Подробнее см. Справочное руководство по программному обеспечению BD FACSDiva™ версии 7.0.

3. Выберите **Overwrite** (Перезаписать) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), чтобы связать значения напряжения ФЭУ.

При этом название параметра изменится с **APC-H7** на **APC-Cy7**. Несовпадающие параметры будут удалены.

ВНИМАНИЕ! Если выбрать **Apply** (Применить) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), напряжение ФЭУ для APC-Cy7 не будет связано с параметрами приложения лизирования с отмывкой и текущие настройки напряжения ФЭУ и название параметра не изменятся.

4. Запишите значение напряжения ФЭУ для параметра APC-Cy7, отмените связь с параметрами приложения лизирования с отмывкой и измените метку параметра **APC-Cy7** на **APC-H7**.
5. Введите значение напряжения ФЭУ для APC-Cy7, записанное для параметра APC-H7.
6. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и программное обеспечение BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство по эксплуатации гранул BD™ Multicolor CompBeads.

Метод настройки 2

Рекомендуется при использовании 6-цветного сочетания реагентов, которое включает APC-Cy7.

1. Используйте семицветные настроечные гранулы BD FACS 7-color setup beads и клиническое ПО BD FACSCanto для установки напря-

жения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.

2. Свяжите параметры приложения лизирования с отмывкой из клинического программного обеспечения BD FACSCanto с экспериментом в программном обеспечении BD FACSDiva.
3. Выберите **Overwrite** (Перезаписать) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра), чтобы связать значения напряжения ФЭУ и настройки компенсации для всех параметров. Несовпадающие параметры будут удалены.

ПРИМЕЧАНИЕ. В случае использования лазерной конфигурации 4-2H-2V (конфигурации BD по умолчанию), при выборе **Overwrite** (Перезаписать) название параметра изменится с **APC-H7** на **APC-Cy7**.

ВНИМАНИЕ! При выборе **Apply** (Применить) в диалоговом окне **Cytometer Settings Mismatch** (Несовпадение настроек цитометра) связаны будут только настройки для параметров, совпадающие с приложением лизирования с отмывкой. При использовании лазерной конфигурации 4-2H-2V и выборе **Apply** (Применить) значения напряжения ФЭУ и настройки компенсации для APC-Cy7 связаны не будут. Название параметра останется **APC-H7**.

Метод настройки 3

Используйте гранулы BD Calibrite Beads и клиническое ПО BD FACSCComp™ для установки напряжения и компенсации флуоресценции в фотоэлектронном умножителе (ФЭУ) и проверки чувствительности цитометра.

Метод настройки 4

Рекомендуется при использовании 8-цветного сочетания реагентов, которое включает фиолетовые флуорохромы.

1. Используйте гранулы BD FACSDiva CS&T IVD Beads и программное обеспечение BD FACSDiva версии 7.0 для настройки значений напряжения ФЭУ. Подробнее см. руководство по эксплуатации BD FACSDiva CS&T IVD Beads.
2. Используйте гранулы BD Multicolor CompBeads и программное обеспечение BD FACSDiva для установки компенсации флуоресценции.

Подробнее см. руководство пользователя цитометра и руководства по эксплуатации.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, или коммерчески доступный контрольный образец цельной крови для оптимизации настроек цитометра и для проверки системы управления качеством¹¹.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Реагент CD45 распознает антиген лейкоцитов человека с молекулярной массой от 180 до 220 килодальтон (кДа), являющийся представителем семейства T200¹².

Антиген CD45 присутствует на всех человеческих лейкоцитах, в т. ч. на лимфоцитах, моноцитах, гранулоцитах, эозинофилах и базофилах периферической крови, и играет роль в сигнальной трансдукции, изменяя сигналы молекул с других поверхностей¹². Антитело CD45 обладает низкой способностью к реакции со зрелыми циркулирующими эритроцитами и тромбоцитами^{12, 13}.

Чувствительность

Чувствительность определяется как максимальная интенсивность окрашивания популяции CD45⁺. Чувствительность измерена на диапазоне концентраций антител. Каждая концентрация реагента тестировалась на цельной крови. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) CD45⁺ определялась для каждого образца и усреднялась по каждой из концентраций. Концентрация антител во флаконах для каждого реагента обеспечивала оптимальную чувствительность при обнаружении клеток CD45⁺. См. табл. 1.

Воспроизводимость

CD45 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 2D1 как часть скрытой панели антител и сообщили согласующиеся друг с другом результаты¹².

Повторяемость

Для определения повторяемости окрашивания каждым реагентом образцы окрашивали несколькими партиями реагентов. При проведении оценки было рассчитано значение средней интенсивности флуоресценции (MFI) для разных образцов, как

показано в табл. 6. 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 6 Повторяемость MFI CD45⁺ лейкоцитов по разным партиям и многим донорам (N)^a

Флуорохром	N ^b	Средняя MFI	Объединенное SD	Объединенный %CV ^c
FITC	20	786,4	95,88	12,19
PerCP ^d	58	606,9	59,00	9,72
PerCP ^e	58	348,9	34,31	9,83
PerCP ^f	57	109,2	10,26	9,39
PerCP-Cy5.5	3	2900,5	182,93	6,31
APC	3	6171,8	96,13	1,56
APC-Cy7 ^d	3	1508,33	122,18	8,10
APC-Cy7 ^e	3	729,83	65,38	8,96
APC-Cy7 ^f	3	238,83	21,20	8,88
APC-H7 ^g	64	12 211,5	91,091	0,89
V500-C ^g	64	10 070,52	46,6	0,5

- a. За исключением APC-H7 и V500-C, которые тестировались с одиночной партией контроля BD™ Multi-Check.
b. N = количество образцов
c. CV = коэффициент вариации
d. Лимфоциты
e. Моноциты
f. Гранулоциты
g. Данные собраны как средняя интенсивность флуоресценции.

Погрешность

Данные погрешности собирали на проточных цитометрах BD FACScan™ и BD FACSCalibur™ с использованием программного обеспечения BD CellQuest версии 3.1 или более поздней для определе-

ния лимфоцитов CD45⁺, моноцитов CD45⁺ и гранулоцитов CD45⁺. Результаты по реагенту CD45 PerCP сравнивали с результатами по реагенту CD45 FITC. См. табл. 7.

Таблица 7. Регрессионный анализ по реагенту CD45 PerCP относительно реагента CD45 FITC

Fluor ^a	N ^b	r	Коэффициент	Свободный член	Диапазон (%)
CD45 ^c	64	0,99	1,02	-0,51	14,9–61,3
CD45 ^d	64	0,98	0,96	0,19	3,2–23,2
CD45 ^e	64	0,98	0,99	0,77	13,9–78,2

- a. Fluor = флуорохром
b. N = количество образцов
c. Лимфоциты
d. Моноциты
e. Гранулоциты

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Только для диагностики in vitro.
- Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают большее разделение, чем другие красители (FITC, PerCP и V500-C). 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 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 обычно собирают 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 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.
Мало или нет клеток	Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия)	На стадиях окрашивания и промывки используйте азид натрия.
	Концентрация клеток слишком мала	Ресуспендируйте свежий образец с более высокой концентрацией; повторите окрашивание и анализ.
	Неисправность цитометра	Устраните неисправность цитометра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krasninskas AM, Wasik MA, Kamoun M, Schretzenmair R, Moore J, Salhany KE. The usefulness of CD64, other monocyte-associated antigens, and CD45 gating in the subclassification of acute myeloid leukemias with monocytic differentiation. *Am J Clin Pathol*. 1998;110:797-805.
2. Borowitz MJ, Shuster J, Carroll AJ, et al. Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. 1997;89:3960-3966.
3. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol*. 1993;100:534-540.
4. Lacombe F, Durrieu F, Briais A, et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1997;11:1878-1886.
5. Stewart CC, Behm FG, Carey JL, et al. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: selection of antibody combinations. *Cytometry*. 1997;30:231-235.
6. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
7. 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.
8. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
9. 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. 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.
11. *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.
12. Schwitzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
13. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:43-55.

BD Simultest™ IMK Plus

Номер по каталогу 349217

IVD



BD, логотип BD, Autocomp, Calibrite, CellFIX, CellWASH, CONSORT, FACS, FACSCalibur, FACScan, FACSCanto, FACSComp, FACSTFlow, FACSort, FACStation, FACSVia, Leucogate, Lysys, Simulset, Simultest и Vacutainer являются товарными знаками компании Becton, Dickinson and Company или ее аффилированных лиц. Все остальные товарные знаки принадлежат соответствующим владельцам. © BD, 2019. Все права защищены.

8/2019

23-13687-05



Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA

EC

REP

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

For the US:

Symbols glossary website:

<http://www.bd.com/symbols-glossary>

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ	5
Клиническое применение	7
3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ.....	9
4. РЕАГЕНТЫ	12
Поставляемые реагенты в количестве, достаточном для проведения 50 тестов	12
Меры предосторожности	18
5. ПРИБОР	21
6. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	22
Условия, мешающие проведению анализа.....	22
7. ПРОЦЕДУРА.....	23
Поставляемые реагенты	23
Необходимые, но не поставляемые реагенты и вещества	23
Окрашивание и фиксация клеток.....	24
Проточная цитометрия	26
Контроль качества	31
8. РЕЗУЛЬТАТЫ	34
Расчет скорректированного содержания.....	34
Расчет абсолютного содержания.....	38
Трехтипная лейкограмма	39

9. ОГРАНИЧЕНИЯ.....	40
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ.....	45
Субпопуляции лейкоцитов	45
Абсолютное содержание.....	48
11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	50
Воспроизводимость внутри выборки	50
Воспроизводимость между приборами	50
Воспроизводимость между лабораториями	50
BD Simultest IMK Plus и сравнительные методы	50
Стабильность окрашенных препаратов клеток	53
Перекрестная реактивность	53
Линейность и восстановление.....	54
12. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	59
ГАРАНТИЯ.....	64

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов BD Simultest™ IMK Plus представляет собой двухцветный прямой иммунофлуоресцентный метод для подсчета процентного содержания следующих субпопуляций зрелых (не бластных) лимфоцитов человека в лизированной цельной крови (LWB): Т-лимфоциты (CD3⁺) и активированные Т-лимфоциты (CD3⁺HLA-DR⁺), В-лимфоциты (CD19⁺), Т-лимфоциты хелперы/индукторы (CD4⁺) и супрессоры/киллеры (CD8⁺) и естественные лимфоциты-киллеры (NK-лимфоциты) (CD16⁺ и (или) CD56⁺). Также с его помощью можно определить отношение хелперов и супрессоров (CD4⁺/CD8⁺).

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Человеческие лимфоциты можно разделить на три крупные субпопуляции на основании их биологической функции и экспрессии антигенов клеточной поверхности, которая коррелирует с функцией: Т-лимфоциты, В-лимфоциты и NK-лимфоциты. Т-лимфоциты участвуют в антиген-специфической клеточно-опосредованной иммунной защите и управляют секрецией иммуноглобулина В-лимфоцитами. На основании функциональных свойств Т-лимфоциты также можно классифицировать как хелперы/индукторы, супрессоры/киллеры и активированные Т-лимфоциты.

Описанные в литературе методы оценки субпопуляций лимфоцитов характеризовались рядом недостатков, так как их результаты зависели от применяемых методик, требовали много времени или не обладали высокой специфичностью в отношении клеточной линии дифференцировки. Классические методы включали идентификацию Т-лимфоцитов путем розеткообразования с эритроцитами барана¹ и идентификацию В-лимфоцитов при помощи эритроцитов барана, покрытых меченных флуорохромом поликлональных антител к поверхностному иммуноглобулину¹. Методы анализа цитолитических лимфоцитов включали метод гемолитических бляшек² и анализ на цитотоксичность для определения высвобождения радиоактивного хрома³.

Реагенты на основе антител используются для идентификации поверхностных клеточных антигенов посредством флуоресцентной микроскопии, электронной микроскопии и анализа с помощью радиоактивной метки⁴. Микроскопические методы не обладают высокой чувствительностью в связи с возможностью анализа ограниченного количества клеток, а методы с использованием радиоактивных изотопов требуют дополнительных мер безопасности и особых условий утилизации отходов. Проточная цитометрия с использованием непрямой иммунофлуоресценции, обеспечивая чувствительность анализа⁵, требует дополнительного этапа добавления вторичного реагента, меченного флуорохромом.

Лимфоциты из цельной крови человека традиционно готовили для цитометрического анализа с использованием методов разделения в градиенте плотности. Исследования показали, что эти методы требовали много времени, включали многочисленные этапы обработки крови и могли приводить к потере субпопуляций лимфоцитов⁶⁻⁸. Метод лизированной цельной крови (LWB), используемый с этим набором, не требует разделения в градиенте плотности, поэтому позволяет сократить время подготовки образца и уменьшить количество манипуляций с цельной кровью⁶ (см. *Monoclonal Antibodies Source Book* (Сборник материалов, посвященных моноклональным антителам) компании BD, раздел 2.2).

Разработка технологии моноклональных антител и проточной цитометрии обеспечила возможность новых подходов к идентификации субпопуляций лейкоцитов и мониторингу иммунитета. Применение моноклональных антител, меченных флуорохромом, и многоцветной проточной цитометрии обеспечивает возможность одновременного количественного определения двух и более субпопуляций лейкоцитов. Мониторинг иммунитета упрощается за счет использования проточных цитометров, таких как система BD FACScan™, которые точно характеризуют клетки с помощью анализа по четырем параметрам. Система BD FACScan при использовании с ПО BD Simultest™ IMK Plus характеризует до 50 000 клеток в одном образце путем одновременного анализа прямого светорассеяния (FSC), бокового светорассеяния (SSC) и многоцветной флуоресценции.

Клиническое применение*

Общее процентное содержание Т- и В-лимфоцитов используется для характеристики некоторых форм иммунодефицита^{9,10} и некоторых типов аутоиммунных заболеваний^{11,12}.

Содержание активированных Т-лимфоцитов (Т-лимфоцитов HLA-DR⁺) может быть повышено при активации иммунной системы¹³, которая может быть вызвана инфекцией¹⁴ или предстоящим отторжением в случае мониторинга трансплантата¹⁵. Истинную причину активации иммунной системы необходимо подтвердить при помощи дополнительных клинических и лабораторных исследований.

Т-лимфоциты хелперы/индукторы являются субпопуляцией Т-лимфоцитов (CD3⁺), которая также экспрессирует антиген CD4. Т-лимфоциты супрессоры/киллеры экспрессируют антиген CD8 и являются преимущественно субпопуляцией Т-лимфоцитов (CD3⁺), хотя субпопуляция NK-лимфоцитов также является CD8⁺ ¹⁶. Определение процентного содержания лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ может быть полезным при мониторинге иммунного статуса пациентов с иммунодефицитами, аутоиммунными заболеваниями или иммунными реакциями. Относительное процентное содержание субпопуляции CD4⁺ снижено, а субпопуляции CD8⁺ — повышено у многих пациентов с врожденными или приобретенными иммунодефицитами⁹, такими как тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД)⁹ и синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД)¹⁷.

* Не во всех исследованиях, процитированных в этом разделе, использовались реагенты BD.

Процентное содержание Т-лимфоцитов супрессоров/киллеров может выходить за рамки нормального референсного диапазона при некоторых аутоиммунных заболеваниях¹¹ и некоторых иммунных реакциях, таких как острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ)¹⁸ и отторжение трансплантата¹⁵. Относительное процентное содержание популяции лимфоцитов CD8⁺ часто понижено при активной системной красной волчанке (СКВ), но может быть повышено у больных СКВ, проходящих стероидную терапию¹.

Отношение Т-лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺ (хелперы/супрессоры), измеренное как отношение CD4 FITC-положительных лимфоцитов к CD8 PE-положительным лимфоцитам, используется для оценки состояния иммунной системы у пациентов с имеющимися или подозреваемыми аутоиммунными заболеваниями^{11,12} или иммунодефицитами^{1,17}. При иммунодефицитах относительное процентное содержание лимфоцитов хелперов зачастую снижается, а лимфоцитов супрессоров — растет. Для упомянутых состояний также характерна Т-клеточная лимфопения^{10,19}. Кроме того, данное отношение используется для мониторинга пациентов с трансплантатами костного мозга на предмет начала острой реакции РТПХ¹⁸. Будучи полезным индикатором, отношение лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺ (хелперы/супрессоры) обладает определенными ограничениями, описанными в разделе 9 «Ограничения» данного руководства пользователя.

Показано, что НК-лимфоциты, идентифицированные как CD3-отрицательные и CD16-положительные и (или) CD56-положительные²⁰, являются промежуточным звеном в проявлении цитотоксичности в отношении определенных опухолевых и инфицированных вирусами клеток-мишеней. НК-опосредованная цитотоксичность не требует присутствия молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) I или II класса на целевых клетках²¹. Активность НК-лимфоцитов подавлена у больных СПИДом и, в некоторых случаях, при СПИД-ассоциированном комплексе и лимфаденопатическом синдроме²².

3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

Набор содержит шесть пар реагентов мышиных моноклональных антител BD Simultest, конъюгированных с FITC и PE, в том числе BD Leucogate™ (CD45/CD14) (реагент А) для установки гейта сбора данных лимфоцитов и BD Simultest™ Control IgG₁ FITC/IgG_{2a} PE (реагент В) для установки маркеров флуоресценции вокруг отрицательной популяции и обнаружения не антиген-специфичного связывания антител. Набор также содержит лизирующий раствор BD Simultest™ IMK Plus Lysing Solution (реагент G) для подготовки клеток методом лизирования цельной крови (LWB). Рекомендуется использовать систему BD FACScan для проточной цитометрии и программное обеспечение BD Simultest IMK Plus для оценки данных.

Свежий образец периферической крови берется методом венопункции и окрашивается в течение 6 часов каждым из шести реагентов антител из набора BD Simultest IMK Plus. При добавлении реагентов на основе моноклональных антител к цельной крови человека меченные флуорохромом антитела специфически связываются с поверхностными антигенами лейкоцитов. Окрашенные образцы затем обрабатываются лизирующим раствором BD Simultest IMK Plus Lysing Solution для лизирования эритроцитов и промываются перед анализом методом проточной цитометрии.

Аликвота окрашенного образца пациента вводится в проточный цитометр и узкой струей проходит через лазерный луч. При возбуждении лазерным лучом окрашенные клетки флуоресцируют, а излучаемый свет собирается и обрабатывается в проточном цитометре. Использование двух флуорохромов обеспечивает одновременный двухцветный анализ, так как при возбуждении аргоновым ионным лазером с длиной волны 488 нм флуорохромы излучают свет с различными длинами волны. FITC-окрашенные лимфоциты излучают желто-зеленый свет (максимум излучения примерно при 515 нм), а PE-окрашенные лимфоциты — красно-оранжевый свет (максимум излучения примерно при 580 нм).

Клетки также взаимодействуют с лазерным пучком, рассеивая свет. Результаты измерения прямого светорассеяния хорошо коррелируют с размером клетки, тогда как боковое светорассеяние является индикатором гранулярности клетки. Проточный цитометр BD FACScan в сочетании с ПО BD Simultest IMK Plus измеряет достаточное количество клеток для обеспечения включения в гейт сбора данных как минимум 2000 лимфоцитов. Файлы данных нужно сохранить в списочном режиме под логичными именами в целях облегчения их поиска для последующего анализа с помощью ПО BD Simultest IMK Plus.

ПО BD Simultest IMK Plus использует BD Leucogate (реагент А), для установки гейта сбора данных лимфоцитов, включающего не меньше 98 % нормальных зрелых (не бластных) лимфоцитов образца. Однако если гейт содержит не менее 3 % моноцитов, ПО автоматически сокращает или сужает гейт светорассеяния, чтобы собрать не менее 95 % лимфоцитов, содержащихся в образце.

ПО идентифицирует и рассчитывает процентное содержание загрязняющих моноцитов, гранулоцитов и клеточных обломков, которые включены в гейт сбора данных лимфоцитов BD Leucogate, на основании SSC, FSC и флуоресцентных свойств. Подробнее о настройке гейтов и автоматической коррекции значений процентного содержания субпопуляций с использованием процентного показателя чистоты гейтированной популяции лимфоцитов программным обеспечением см. в руководстве пользователя ПО *BD Simultest IMK Plus User's Guide*.

Присутствие бластных клеток может помешать процедуре гейтирования и привести к ошибке обработки данных. Поэтому образцы, содержащие бластные клетки, необходимо анализировать другими методами. Если ПО неспособно настроить гейт, на распечатке появится сообщение. Полный список сообщений ПО об ошибках см. в руководстве пользователя ПО *BD Simultest IMK Plus User's Guide*.

ПО использует отрицательный контроль (реагент В) для установки маркеров флуоресценции-1 (FL1) и флуоресценции-2 (FL2) вокруг популяции отрицательных лимфоцитов и для количественной оценки имеющегося не антиген-специфичного связывания антител, особенно обусловленного рецепторами Fc. При наличии более 5 % событий контроля выше отрицательных контрольных маркеров FL1 и FL2 на экране компьютера и на лабораторной распечатке в отношении контрольной пробирки В появляется сообщение об ошибке «too much nonspecific staining» («слишком значительное неспецифическое окрашивание»). При обработке программным обеспечением пробирки с отрицательным контролем оператор должен следить за сообщениями об ошибках, которые указывают на наличие не антиген-специфичного связывания антител.

Отрицательный контроль представляет собой смесь конъюгированных моноклональных антител с теми же флуорохромами (FITC и PE), что и в аналитических реагентах. Антитела контроля специфичны в отношении антигенов, не присутствующих на лейкоцитах человека. Контроль должен использоваться для окрашивания отдельной аликвоты каждого образца пациента.

Для каждого образца пациента используются гейт сбора данных лимфоцитов, установленный с помощью BD Leucogate (пробирка А), и маркеры флуоресценции, определенные с помощью контроля (пробирка В), для анализа остальных пробирок (с С по F). Если в главном меню ПО BD Simultest IMK Plus выбрана программная опция Quadrant Correction (Коррекция квадрантов), результаты подсчета субпопуляций лимфоцитов в пробирках с С по F выражаются в виде процентного содержания лимфоцитов в гейте сбора данных.

ПО BD Simultest IMK Plus предоставляет отчет с количественными характеристиками этих иммунологически значимых субпопуляций лимфоцитов в лизированной цельной крови (LWB) в виде их процентных долей от общего количества циркулирующих (не бластных) лимфоцитов человека и указывает отношение лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺. Если эта опция ПО не выбрана, результаты выражаются как процентные доли от суммы гейтированных событий.

В целях контроля качества ПО автоматически определяет трехтипную лейкограмму с процентными долями моноцитов, гранулоцитов и лимфоцитов и распечатывает ее только для сравнения с результатами стандартного лабораторного дифференцированного подсчета²³. Для получения трехтипной лейкограммы ПО использует алгоритм идентификации трех клеточных популяций на основании FSC, SSC и флуоресценции. Моноциты CD14-положительны и характеризуются сигналом SSC, промежуточным между сигналами SSC лимфоцитов и гранулоцитов. Лимфоциты и гранулоциты также можно отличить на основании их сигнала SSC. Лимфоциты характеризуются низким сигналом SSC, а гранулоциты — высоким сигналом SSC.

ПРИМЕЧАНИЕ Дифференцированный подсчет, произведенный BD Simultest IMK Plus, следует использовать только для сравнения с независимым дифференцированным подсчетом лейкоцитов в целях контроля качества и не следует использовать вместо независимого лабораторного дифференцированного подсчета лейкоцитов в картах пациентов, а также вводить в программное обеспечение BD Simultest IMK Plus для получения значений абсолютного содержания.

4. РЕАГЕНТЫ

Поставляемые реагенты в количестве, достаточном для проведения 50 тестов

Все реагенты моноклональных антител содержат мышиные иммуноглобулины, конъюгированные с FITC или PE, в 1,0 мл буферного физиологического раствора, содержащего желатин и 0,1 % азида натрия. Моноклональные антитела вырабатываются в результате слияния клеток мышиной миеломы с клетками селезенки или лимфатических узлов мышей BALB/c. Отношение «флуоресцеин на белок» (F:P) для реагентов моноклональных антител BD составляет от 2 до 10. Отношение F:P для каждого реагента оптимизировано для целевого применения.

Реагент А, BD Leucogate (CD45/CD14), 1,0 мл

BD Leucogate (CD45/CD14) используется для определения и оценки гейта светорассеяния, который дифференцирует лимфоциты от гранулоцитов, моноцитов, незлизованных или ядросодержащих эритроцитов и клеточных обломков. Этот реагент содержит меченный FITC CD45, клон 2D1^{24–26}, для идентификации лейкоцитов и меченный PE CD14, клон МРР9^{27–29}, для идентификации моноцитов.

Антитела CD45³⁰ были получены в результате гибридизации клеток мышинной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных моноклеарными клетками периферической крови человека (PBMС). Антитела состоят из тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей. Антиген CD45 присутствует на всех человеческих лейкоцитах и играет роль в передаче сигналов, модифицируя сигналы других поверхностных молекул³⁰.

Молекулярная масса антигена, распознаваемого данными антителами, составляет от 170 до 220 килодальтон (кДа)³⁰.

Антитела CD14²⁷ были получены в результате гибридизации клеток мышинной миеломы Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных моноцитами периферической крови пациента, страдающего ревматоидным артритом. Эти антитела состоят из мышинных тяжелых цепей IgG_{2b} и легких каппа-цепей. Молекулярная масса антигена CD14, распознаваемого данными антителами, составляет 53 кДа³¹. Это антиген миелоидной дифференциации³¹, присутствующий на 75–90 % моноцитов человека³². Антитела CD14 слабо реагируют с гранулоцитами³³.

Реагент В, контрольный, 1,0 мл

Изотипический контрольный реагент используется для установки квадрантных маркеров FL1 и FL2 вокруг популяции неокрашенных (отрицательных) лимфоцитов в целях разграничения отрицательной и положительной клеточной популяции и оценки не антиген-специфичного связывания антител, особенно обусловленного рецепторами Fc. Он содержит меченный IgG₁, клон X40, и меченный PE IgG_{2a}, клон X39, мышинные моноклональные антитела, которые специфично реагируют с гемоцианином моллюска *Megathura crenulata* (KLH) — антигеном, отсутствующим на лейкоцитах человека.

Реагент С, CD3/CD19, 1,0 мл

CD3/CD19 используется для подсчета Т- и В-лимфоцитов. Он содержит меченный FITC CD3, клон SK7^{34–37}, для идентификации Т-лимфоцитов и меченный PE CD19, клон 4G7³⁸, для идентификации В-лимфоцитов.

Антитела CD3³⁶ получены в результате гибридизации клеток мышинной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных человеческими тимоцитами. Эти антитела состоят из мышинных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей. CD3 реагирует с эпсилон-цепью комплекса антиген CD3 / Т-клеточный рецептор для распознавания антигенов (TCR). Данный комплекс состоит не менее чем из четырех белков молекулярной массой от 20 до 30 кДа³⁹.

Антиген, распознаваемый антителами CD3, нековалентно связан с Т-клеточным рецептором α/β или γ/δ (70–90 кДа)⁴⁰.

Антитела CD19³⁸ получены в результате гибридизации клеток мышинной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками человека с хронической лимфоцитарной лейкемией. Антитела состоят из тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей. Антиген CD19 присутствует на В-лимфоцитах человека на всех стадиях созревания, но отсутствует на плазматических клетках. Этот антиген может быть вовлечен в процессы активации и пролиферации В-лимфоцитов⁴¹. Молекулярная масса антигена, распознаваемого этими антителами, составляет 90 кДа⁴¹.

Реагент D, CD4/CD8, 1,0 мл

CD4/CD8 используется для одновременной характеристики лимфоцитов хелперов/индукторов и супрессоров/киллеров. Он содержит меченный FITC CD4, клон SK3^{42,43}, для идентификации лимфоцитов хелперов/индукторов и меченный PE CD8, клон SK1^{42,43}, для идентификации лимфоцитов супрессоров/киллеров.

Антитела CD4⁴² получены в результате гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных Т-лимфоцитами периферической крови человека. Они состоят из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей. Антитела CD4 распознают антиген CD4, который взаимодействует с молекулами II класса ГКГС и является основным рецептором для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)^{44,45}. Молекулярная масса этого антигена составляет 59 кДа. Цитоплазматическая часть антигена связывается с протеин-тирозинкиназой p56^{lck}. Антиген CD4 обладает способностью к регуляции функции комплекса антиген CD3 / TCR⁴⁶. Антитела CD4 реагируют с моноцитами/макрофагами и Т-лимфоцитами хелперами/индукторами⁴⁷.

Антитела CD8⁴² получены в результате гибридизации клеток мышиной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных Т-лимфоцитами периферической крови человека. Они состоят из мышиных тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей. Антиген CD8 присутствует на субпопуляции человеческих Т-лимфоцитов супрессоров/киллеров^{35,43}, а также на субпопуляции NK-лимфоцитов¹⁶. Антигенная детерминанта CD8 взаимодействует с молекулами I класса ГКГС, в результате чего повышается адгезия между Т-лимфоцитами CD8⁺ и клетками-мишенями^{48–50}. Связывание антигена CD8 с молекулами I класса ГКГС усиливает активацию покоящихся Т-лимфоцитов^{48–51}. Антиген CD8 экспрессируется в виде дисульфид-связанного двухмолекулярного комплекса с субъединицей α с молекулярной массой 32 кДа^{52,53}. Антиген CD8 связан с p56^{lck}. Комплекс CD8:p56^{lck} может играть роль в активации Т-лимфоцитов через опосредование взаимодействия между антигеном CD8 и комплексом антиген CD3 /TCR^{50,51}.

Реагент E, CD3/Anti-HLA-DR, 1,0 мл

CD3/Anti-HLA-DR используется для подсчета Т-лимфоцитов, не Т-лимфоцитов DR⁺ (в основном В-лимфоцитов) и активированных Т-лимфоцитов. Он содержит меченный FITC CD3, клон SK7^{34–37}, для идентификации Т-лимфоцитов и меченный PE Anti-HLA-DR, клон L243⁵⁴, для идентификации не Т-лимфоцитов DR⁺ и активированных Т-лимфоцитов.

Антитела Anti-HLA-DR получены путем гибридизации клеток мышиной миеломы NS1/1-AG4 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных лимфобластоидными В-клетками человека линии RPMI 8866. Они состоят из мышиных тяжелых цепей IgG_{2a} и легких каппа-цепей. Антиген HLA-DR (человеческий лейкоцитарный антиген, D-связанный) — это молекула II класса ГКГС человека. Данный антиген — это трансмембранный гликопротеин, состоящий из субъединиц α и β молекулярной массой 36 и 27 кДа соответственно^{54–55}. Антитела реагируют с неpolиморфным эпитопом HLA-DR^{54–56}. Антиген экспрессируется на В-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, активированных Т-лимфоцитах, активированных NK-лимфоцитах и недифференцированных клетках-предшественниках^{14,19,57–60}.

Реагент F, CD3/CD16+CD56, 1,0 мл

CD3/CD16+CD56 используется для идентификации Т- и NK-лимфоцитов. Он содержит меченный FITC-labeled CD3, клон SK7^{34–37}, для идентификации Т-лимфоцитов. Он также содержит меченный PE CD16, клон B73.1^{61–64}, и меченный PE CD56, клон MY31^{63,65}, для идентификации популяций NK-лимфоцитов наряду с субпопуляциями Т-лимфоцитов.

Антитела CD16⁶⁴ были получены в результате гибридизации клеток мышиной миеломы P3X-63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных NK-лимфоцитами. Эти антитела состоят из тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей^{61–63}. Антиген, распознаваемый антителами CD16, является белком с молекулярной массой от 50 до 65 кДа — рецептором IgG Fc III, присутствующим на NK-лимфоцитах и нейтрофилах²⁰.

Антитела CD56⁶⁵ были получены в результате гибридизации клеток мышиной миеломы Sp2/0 с клетками мышей (B6xBALB/c)F₁, иммунизированных клетками линии KG1a. Антитела состоят из тяжелых цепей IgG₁ и легких каппа-цепей. Молекулярная масса гликозилированного антигена, распознаваемого данными антителами, составляет от 175 до 220 кДа^{20,66} (или 137 кДа в дегликозилированном состоянии⁶⁷); он присутствует на NK-лимфоцитах. Антиген CD56 вовлечен в адгезию однотипных нервных клеток и дифференцировку клеток в ходе эмбриогенеза⁶⁵.

Реагент G, 10-кратный концентрат лизирующего раствора BD Simultest IMK Plus Lysing Solution, 60 мл

Реагент G содержит 10-кратный концентрат буферного лизирующего раствора с менее чем 50 % диэтиленгликоля и менее чем 10 % формальдегида. При хранении при температуре 2–25 °C 10-кратный концентрат стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке. Для использования разведите его водой для анализа комнатной температуры (20–25 °C) в отношении 1 : 10. Храните образец в стеклянном контейнере при комнатной температуре. Готовый раствор стабилен в течение 1 месяца при комнатной температуре.

Значения концентрации приведены в следующей таблице.

Реагент	Компонент	Концентрация (мкг/мл)
A: BD Leucogate (CD45/CD14)	CD45 FITC	25
	CD14 PE	12,5
B: Контрольный образец	IgG ₁ FITC	25
	IgG _{2a} PE	12,5
C: CD3/CD19	CD3 FITC	25
	CD19 PE	6
D: CD4/CD8	CD4 FITC	1,5
	CD8 PE	25

Реагент	Компонент	Концентрация (мкг/мл)
E: CD3/HLA-DR	CD3 FITC	25
	Anti-HLA-DR PE	3,1
F: CD3/CD16+CD56	CD3 FITC	25
	CD16 PE	12,5
	CD56 PE	25

Меры предосторожности

- Только для диагностики *in vitro*.
- Реагенты антител стабильны при хранении при 2–8 °C до истечения срока годности, указанного на маркировке. Не используйте реагент после истечения срока хранения.
- Реагенты антител нельзя замораживать или подвергать прямому воздействию света при хранении или инкубации с клетками.
- Продолжительность инкубации или центрифугирования, а также отличные от указанных температуры могут быть причиной ошибки.
- Для получения оптимальных результатов необходимо окрасить образцы крови не позднее чем через 6 часов после венопункции.
- Изменение внешнего вида реагентов, например выпадение осадка или обесцвечивание, свидетельствует о нестабильности или порче. В таком случае реагенты использовать не следует.
- Реагент антител содержит в качестве консерванта азид натрия; тем не менее, следует избегать микробного загрязнения, которое может стать причиной ошибочных результатов.
- Реагент G содержит от 25 до < 50 % 2,2'-оксибисэтанола (диэтиленгликоля), номер CAS 111-46-6; от 5 до < 10 % формальдегида, номер CAS 50-00-0, и от 3 до < 5 % метанола, номер CAS 67-56-1. Лизирующий раствор считается опасным в рамках Согласованной на глобальном уровне системы классификации и маркировки химических веществ (ГСХ). Загрузите паспорт безопасности материала с сайта regdocs.bd.com.

	Опасность
 	H302+H312+H332: наносит вред при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании. H315: вызывает раздражение кожи. H319: вызывает серьезное раздражение глаз. H317: может вызывать аллергическую кожную реакцию. H341: предположительно вызывает генетические дефекты. H350: может вызывать рак. H371: может нанести вред органам. H335: может вызывать раздражение дыхательных путей. H373: может наносить вред органам в результате длительного или многократного воздействия. P201: получить специальные инструкции перед использованием. P202: не использовать до тех пор, пока не прочтаете и не поймете все инструкции и меры безопасности. P260: не вдыхать вещество в виде пыли, дыма, газа, тумана, паров или в распыленном состоянии. P264: после работы тщательно вымыться. P272: не выносить загрязненную одежду с места работы. P280: пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз/лица. P333+P313: в случае раздражения кожи или появления сыпи обратиться к врачу. P337+P313: если раздражение глаз не проходит, обратиться к врачу. P304+P340: ПРИ ВДЫХАНИИ: вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении. P312: при плохом самочувствии обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. P308+P313: в случае воздействия, в том числе предположительного: обратиться к врачу.

В США в дополнение к показанным выше предупреждениям применяются следующие.

	Опасность
 	H402: вредно для водных организмов. P271: использовать только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении. P273: не допускать попадания в окружающую среду. P270: не принимать пищу, не пить и не курить в процессе использования этого продукта. P281: использовать необходимые средства индивидуальной защиты. P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P302+P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды. P301+P312: ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: при плохом самочувствии обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. P330: прополоскать рот. P321: специальные меры (см. на этом маркировочном знаке). P363: постирать загрязненную одежду перед последующим использованием. P405: хранить в закрытом помещении. P403: хранить в хорошо вентилируемом месте. P233: держать крышку контейнера плотно закрытой. P501: утилизировать содержимое/контейнер на подходящем объекте по обработке и утилизации отходов в соответствии с применимыми законами, постановлениями и характеристиками продукта на момент утилизации.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Любые биологические образцы и материалы, соприкасающиеся с ними, представляют потенциальную биологическую опасность. Обращайтесь с материалами как с потенциальными источниками инфекции^{68,69} 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.

5. ПРИБОР

Набор BD Simultest IMK Plus предназначен для использования с проточными цитометрами BD, оснащенными соответствующим компьютерным оборудованием и программным обеспечением. Проточный цитометр должен быть оснащен для обнаружения двухцветной флуоресценции, FSC и SSC.

Рекомендуется использовать следующую приборную систему:

- Система проточного цитометра BD FACScan, оснащенная детектором трехцветной флуоресценции и детектором светорассеяния по двум параметрам. Дополнительные сведения см. в руководстве пользователя программного обеспечения *BD FACScan User's Guide*.
- Компьютерная система BD CONSORT™ 30 или CONSORT 32 с периферией (включена в систему BD FACScan). Подробная информация об эксплуатации представлена в руководстве пользователя *BD CONSORT 30 Software User's Guide* или в руководстве пользователя *BD CONSORT 32 System User's Guide*.
- Программное обеспечение BD Simultest IMK Plus. Дополнительные сведения см. в руководстве пользователя программного обеспечения *BD Simultest IMK Plus User's Guide*.
- Гранулы BD Calibrite™ Beads (номер по каталогу 349502). Эти гранулы можно использовать, чтобы настроить напряжение фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность прибора перед сбором данных на проточном цитометре BD FACScan. Подробную информацию об использовании см. в инструкции по эксплуатации гранул *BD Calibrite Beads*.
- Программное обеспечение BD Autocomp™. Дополнительные сведения см. в руководстве пользователя программного обеспечения *BD Autocomp Software User's Guide*.

Все рабочие характеристики были получены при использовании вышеуказанной приборной системы. Прочие системы обладают другими характеристиками.

6. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Проведите забор крови асептически с помощью венопункции^{5,70} в стерильную пробирку для забора крови с ЭДТА BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube (с лиловой крышкой). Для исследования требуется не менее 1 мл цельной крови. Для получения оптимальных результатов необходимо окрасить образцы крови не позднее чем через 6 часов после забора. До готовности к окрашиванию храните кровь с антикоагулянтом при комнатной температуре (20–25 °C) не больше 6 часов. Образцы крови, охлажденные перед окрашиванием, могут давать искаженные результаты.

Перед окрашиванием выполните подсчет лейкоцитов (WBC) и дифференцированный подсчет лейкоцитов одного и того же образца цельной крови. Допустимый диапазон концентрации лейкоцитов составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ лейкоцитов на мкл. Образцы, в которых содержание лейкоцитов превышает $9,8 \times 10^3$ на мкл, следует развести неконцентрированным физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) с добавлением 0,1 % азида натрия (см. раздел 9 «Ограничения»). Если содержание лейкоцитов меньше $3,5 \times 10^3$ на мкл, нужно отобрать еще немного крови и провести процедуру сепарации для концентрирования клеток.

Условия, мешающие проведению анализа

Не используйте заранее стабилизированные и заготовленные клетки. Образцы цельной крови, охлажденные перед окрашиванием, могут давать искаженные результаты. Для получения оптимальных результатов необходимо окрасить образцы крови не позднее чем через 6 часов после венопункции. Образцы пациентов, принимающих иммунодепрессивные препараты, могут не обеспечивать надлежащего разрешения. Присутствие аномальных (бластных) клеток либо нелизированных или ядросодержащих эритроцитов может повлиять на результаты теста. Гемолизированные образцы или образцы объемом меньше 1 мл цельной крови в пробирке для забора анализу не подлежат.

ВНИМАНИЕ! При заборе, обращении и утилизации всех образцов крови человека, а также реагентов, потенциально обладающих канцерогенным действием, необходимо соблюдать соответствующие меры предосторожности.

7. ПРОЦЕДУРА

Поставляемые реагенты

См. «Поставляемые реагенты» в количестве, достаточном для проведения 50 тестов, и «Меры предосторожности» в разделе 4 «Реагенты».

Необходимые, но не поставляемые реагенты и вещества

- Пробирки для забора крови с ЭДТА BD Vacutainer EDTA Blood Collection Tubes или аналогичные.
- Одноразовые полистирольные пробирки 12 × 75 мм Falcon®* или аналогичные.
- Мешалка «вортекс».
- Низкоскоростная центрифуга (200g) с горизонтальным ротором и вставками для пробирок 12 × 75 мм
- Вакуумный аспиратор с ловушкой.
- Микропипетка с наконечниками.
- 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%-й раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Храните не более 1 недели в темной стеклянной посуде при 2–8 °C.
- Проточная жидкость BD FACSTFlow™ Sheath Fluid (номер по каталогу 342003).

ВНИМАНИЕ! Для разбавления гранул BD Calibrite Beads используйте только проточную жидкость BD FACSTFlow Sheath Fluid.

* Falcon является зарегистрированным товарным знаком компании Corning Incorporated.

- Вода для анализа (дистиллированная и деионизированная).

Окрашивание и фиксация клеток

Образцы цельной крови вначале окрашиваются реагентами с А по F. Затем используется разведенный реагент G (неконцентрированный лизирующий раствор BD Simultest IMK Plus Lysing Solution) для лизирования эритроцитов после окрашивания. При достаточном количестве лейкоцитов сепарация клеток перед окрашиванием не нужна. См. раздел 6 «Отбор и подготовка образцов» и раздел 9 «Ограничения». Пробирки необходимо защищать от прямого света. Выполняйте процедуру при комнатной температуре (20–25 °C), используя реагенты с такой же температурой. См. «Меры предосторожности» в разделе 4 «Реагенты».

1. Для каждого образца пациента подготовьте шесть полистирольных пробирок 12 × 75 от А до F. На каждую пробирку нанесите идентификационный номер образца.
2. Внесите 20 мкл реагента А в пробирку А, 20 мкл реагента В в пробирку В, 20 мкл реагента С в пробирку С, 20 мкл реагента D в пробирку D, 20 мкл реагента Е в пробирку Е и 20 мкл реагента F в пробирку F.
3. На дно каждой из шести помеченных пробирок аккуратно внесите с помощью дозатора с новым наконечником 100 мкл тщательно перемешанной цельной крови с антикоагулянтом надлежащей концентрации. Необходимая концентрация лейкоцитов составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл. Тщательно встряхните на «вортексе» на низкой скорости в течение 3 секунд и инкубируйте в течение 15–30 минут при комнатной температуре (20–25 °C).

ПРИМЕЧАНИЕ В ходе инкубации необходимо защищать образцы от прямого воздействия света, а также принять меры для предотвращения стекания крови по стенке пробирки. Если цельная кровь останется на стенке пробирки, она может не окраситься реагентом.

4. Разведите 10-кратный концентрат лизирующего раствора BD Simultest IMK Plus Lysing Solution в 10 раз в соответствии с инструкциями для реагента G в пункте «Поставляемые реагенты в количестве, достаточном для проведения 50 тестов» раздела 4 «Реагенты». Добавьте в каждую пробирку по 2 мл неконцентрированного лизирующего раствора комнатной температуры (20–25 °C). Сразу же тщательно встряхните на «вортексе» при низкой скорости в течение 3 секунд и инкубируйте в течение 10–12 минут при комнатной температуре (20–25 °C) в темноте. Не инкубируйте дольше 12 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ Не допускайте излишне продолжительного воздействия лизирующих реагентов на клетки, так как это может привести к разрушению лейкоцитов. См. раздел 9 «Ограничения».

5. Сразу после инкубации центрифугируйте пробирки со скоростью 300g в течение 5 минут при комнатной температуре (20–25 °C).
6. Отберите надосадочную жидкость, оставив в каждой пробирке приблизительно 50 мкл жидкости, чтобы не повредить осадок.
7. Тщательно встряхните на «вортексе» на низкой скорости, чтобы ресуспендировать клеточный осадок в остаточной жидкости, и добавьте в каждую пробирку по 2 мл раствора BD CellWASH или физиологического раствора с фосфатным буфером с добавлением 0,1 % азида натрия. Тщательно встряхните на «вортексе» на низкой скорости в течение 3 секунд. Центрифугируйте со скоростью 200g в течение 5 минут при комнатной температуре (20–25 °C).
8. Отберите надосадочную жидкость, оставив в каждой пробирке приблизительно 50 мкл жидкости, чтобы не повредить осадок.
9. Тщательно встряхните на «вортексе» на низкой скорости, чтобы ресуспендировать клеточный осадок в остаточной жидкости, и добавьте в каждую пробирку по 0,5 мл раствора BD CellFIX или 1%-го раствора параформальдегида. Тщательно встряхните на

«вортексе» на низкой скорости в течение 3 секунд. Удостоверьтесь, что клетки тщательно перемешались с фиксирующим раствором.

10. Клетки готовы к анализу на проточном цитометре. Наденьте крышки или накройте подготовленные пробирки и храните их в темноте при температуре 2–8 °C до анализа в проточном цитометре. Анализ фиксированных клеток необходимо выполнить не позднее чем через 24 часа после окрашивания. Тщательно встряхните клетки на «вортексе» на низкой скорости, чтобы снизить агрегацию, перед их обработкой на проточном цитометре.

Проточная цитометрия

Для выполнения анализа на двухцветном проточном цитометре следуйте инструкциям компании BD (см. раздел 5 «Прибор»). Рекомендуется использовать следующий общий подход. Проточный цитометр BD FACScan вначале готовится для анализа образца с использованием гранул BD Calibrite Beads и ПО BD Autocomp. Затем пробирки с окрашенными образцами обрабатываются на проточном цитометре и анализируются с помощью ПО BD Simultest IMK Plus. Подробные инструкции по применению представлены в руководстве пользователя *BD FACScan User's Guide*, в руководстве пользователя гранул *BD Calibrite Beads*, в руководстве пользователя ПО *BD Autocomp Software User's Guide* и в руководстве пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*. Рекомендуется сохранять данные пациента для последующего анализа файлов данных.

Установите и скорректируйте компенсацию проточного цитометра BD FACScan. При помощи гранул BD Calibrite Beads и ПО BD Autocomp установите значения напряжения фотоэлектронного умножителя ФЭУ, скорректируйте компенсацию флуоресценции и проверьте чувствительность детектора. См. руководство пользователя гранул *BD Calibrite Beads*, руководство пользователя ПО *BD Autocomp Software User's Guide* и руководство пользователя *BD FACScan User's Guide*.

Обработайте все пробирки с образцами на проточном цитометре и введите данные в файлы со списочным режимом с помощью ПО BD Simultest IMK Plus. Подробные инструкции по применению ПО см. в руководстве пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*. ПО автоматически собирает достаточное количество событий для получения как минимум 2000 лимфоцитов в гейте лимфоцитов. ПО подсчитывает количество событий в каждом квадранте и затем рассчитывает процентную долю положительных лимфоцитарных событий для квадранта 1 (Q1) (низкая желто-зеленая / высокая красно-оранжевая флуоресценция), Q2 (высокая желто-зеленая / высокая красно-оранжевая флуоресценция или двойная флуоресценция), Q3 (низкая желто-зеленая / низкая красно-оранжевая флуоресценция) и Q4 (высокая желто-зеленая / низкая красно-оранжевая флуоресценция) (см. рис. 1).

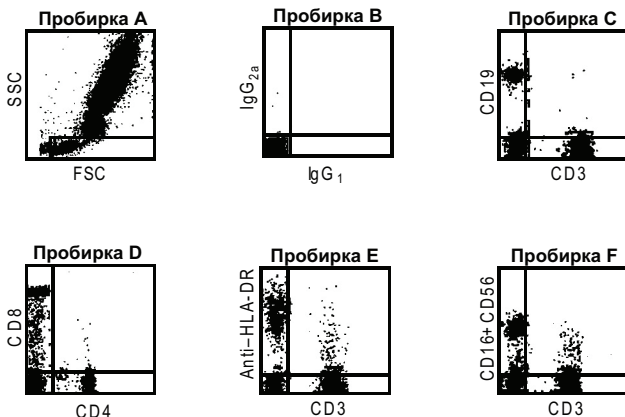
Рис. 1 Квадранты отображения флуоресценции (обозначенные как Q1–Q4) и соответствующие цвета.

Q1 Низкая желто-зеленая / высокая красно-оранжевая	Q2 Высокая желто-зеленая / высокая красно-оранжевая (двойная флуоресценция)
Q3 Низкая желто-зеленая / низкая красно-оранжевая	Q4 Высокая желто-зеленая / низкая красно-оранжевая

Для гейтирования по лимфоцитам используется пробирка A BD Leucogate. Проточный цитометр BD FACScan с ПО BD Simultest IMK Plus автоматически устанавливает гейт сбора данных лимфоцитов для устранения большей части клеточных обломков, моноцитов и гранулоцитов (см. рис. 2 и рис. 3). Информация о порядке установки гейта представлена в руководстве пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*. В случае недостаточного разделения популяций образец будет отмечен флажком для предупреждения оператора и появится сообщение. Ошибки при гейтировании образца могут быть вызваны подготовкой образца или настройкой прибора.

Контрольная пробирка B используется для установки маркеров интенсивности флуоресценции. ПО BD Simultest IMK Plus автоматически использует гейт сбора данных лимфоцитов, установленный с помощью BD Leucogate, и затем размещает маркеры FL1 и FL2. Эти маркеры определяют границы между положительно окрашенными и неокрашенными событиями в гейте лимфоцитов. Маркеры флуоресценции следует устанавливать вокруг отрицательной популяции, которая выглядит как кластер событий с низкой желто-зеленой и низкой красно-оранжевой флуоресценцией.

Рис. 2 Анализ образца лизированной цельной крови (LWB), полученного от гематологически здорового пациента мужского пола, на проточном цитометре BD FACScan. Образец окрашен реагентами BD Simultest IMK Plus. Реагент BD Leucogate (CD45/CD14) использовался для уменьшения количества клеточных обломков, моноцитов и гранулоцитов в гейте, показанном под пробиркой А. Для пробирок с В по F показаны точечные графики зависимости FL2 (ось Y) от FL1 (ось X).



Если после установки маркеров более 5 % общего количества событий в пробирке В осталось в Q1 (низкая желто-зеленая / высокая красно-оранжевая флуоресценция), Q2 (высокая желто-зеленая / высокая красно-оранжевая флуоресценция) и Q4 (высокая желто-зеленая / низкая красно-оранжевая флуоресценция), это свидетельствует о наличии не антиген-специфичного связывания антител. Программное обеспечение покажет оператору предупреждающее сообщение «too much nonspecific staining» («слишком значительное неспецифическое окрашивание»). При появлении данного сообщения об ошибке следует

отобрать новый образец из исходной аликвоты цельной крови с антикоагулянтom и повторить всю процедуру окрашивания.

Рис. 3 Популяции мононуклеарных клеток в квадрантах с Q1 по Q4 для пробирок с С по F. Популяции отражают реакционную способность исходного реагента. (Полный список реакционных способностей см. в описании реагентов в пункте «Поставляемые реагенты в количестве, достаточном для проведения 50 тестов» в разделе 4 «Реагенты».)

Пробирка С (CD3/CD19)

Q1 В-лимфоциты CD3 ⁻ CD19 ⁺	Q2 Не антиген-специфичное связывание антител ^а
Q3 Неокрашенные лимфоциты; загрязняющие моноциты, гранулоциты и клеточные обломки	Q4 Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻

Пробирка D (CD4/CD8)

Q1 Т-лимфоциты супрессоры/киллеры и NK-лимфоциты CD4 ⁻ CD8 ⁺	Q2 Лимфоциты CD4 ⁺ CD8 ⁺
Q3 Неокрашенные лимфоциты; гранулоциты и клеточные обломки	Q4 Лимфоциты хелперы/индукторы CD4 ⁺ CD8 ⁻ ; моноциты

а. См. раздел 9 «Ограничения».

Пробирка E (CD3/Anti-HLA-DR)

Q1 В-лимфоциты CD3 ⁻ Anti-HLA-DR ⁺ , активированные NK-лимфоциты; моноциты/макрофаги	Q2 Активированные Т-лимфоциты CD3 ⁺ Anti-HLA-DR ⁺
Q3 Неокрашенные лимфоциты; загрязняющие моноциты, гранулоциты и клеточные обломки	Q4 Т-лимфоциты CD3 ⁺ Anti-HLA-DR ⁻

Пробирка F (CD3/CD16+CD56)

Q1 NK-лимфоциты CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	Q2 Субпопуляция Т-лимфоцитов CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺
Q3 Неокрашенные лимфоциты; загрязняющие моноциты, гранулоциты и клеточные обломки	Q4 Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁻

Данные для пробирок C, D, E и F получаются и анализируются ПО BD Simultest IMK Plus с использованием гейтов и маркеров, установленных с помощью пробирок A и B. Проанализируйте эти результаты, используя критерии, представленные в пункте «Контроль качества», в соответствии с инструкциями в разделе 8 «Результаты».

Контроль качества

Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать гранулы BD Calibrite Beads и ПО BD Autocomp для настройки значений напряжения ФЭУ, настройки компенсации флуоресценции и проверки чувствительности прибора перед использованием реагентов BD Simultest IMK Plus на проточном цитометре BD FACScan. Инструкции по оптимизации проточного цитометра перед анализом образцов пациентов см. в Приложении А руководства пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*.

Отрицательный контроль, включенный в набор реагентов BD Simultest IMK Plus, тестируется с каждым образцом пациента для установки маркеров флуоресценции FL1 и FL2 между отрицательно и положительно окрашенными кластерами лимфоцитов, а также для определения наличия не антиген-специфичного связывания антител, которое может привести к ошибочным результатам. Изучите отображение на экране компьютера и лабораторный отчет для контрольной пробирки B. При наличии более 5 % событий за пределами квадранта 3 для контрольной пробирки на экране появляется сообщение для пробирки B «too much nonspecific staining» («слишком значительное неспецифическое окрашивание»). В этом случае результаты для пробирок с C по F следует признать сомнительными. См. «Поиск и устранение неисправностей», раздел 12, в конце данного руководства пользователя. Необходимо визуально проверить точечные графики, полученные для пробирок с C по F, чтобы убедиться в правильности установки маркеров флуоресценции и в наличии минимального не антиген-специфичного связывания антител.

Рекомендуется ежедневно измерять контрольный образец, полученный от здорового взрослого, для оптимизации настроек прибора и контроля качества системы. Достоверные результаты образца крови гематологически здорового человека приведены на рис. 2.

Если при визуальной проверке точечных графиков или контурных изображений отмечается недостаточное разделение положительного и отрицательного кластера, можно сделать вывод о наличии не антиген-специфичного связывания антител и забраковать результаты тестирования. Возможно, не антиген-специфичное связывание антител наблюдается в связи с плохим состоянием клеток. Если наблюдается не антиген-специфичное связывание антител, ознакомьтесь с разделом 12 «Поиск и устранение неисправностей».

Программное обеспечение BD Simultest IMK Plus автоматически проверяет данные и предупреждает оператора о возможных ошибках. Список возможных сообщений см. в приложении D руководства пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*. Программное обеспечение использует следующие критерии оценки качества собранных данных при проверке точечных графиков, полученных для каждого образца.

1. Оператор должен отклонить результаты, если для контрольного образца с нормальным содержанием получено любое из следующих сообщений об ошибке: нет разделения между клеточными популяциями; слишком малое количество лимфоцитов (менее 500); чрезмерное загрязнение эритроцитами или ядросодержащими эритроцитами и клеточными обломками (более 20 %); чрезмерное загрязнение моноцитами (более 4 %) или гранулоцитами (более 4 %) в гейте лимфоцитов.
2. Если невозможно выявить причины сбоя контрольного образца, следует окрасить и обработать другой контрольный образец и повторить всю процедуру окрашивания на всех последующих образцах.

3. В образцах с наличием ядросодержащих эритроцитов может наблюдаться чрезмерное количество клеточных обломков из-за неполного лизиса ядросодержащих эритроцитов лизирующим раствором BD Simultest IMK Plus Lysing Solution (реагент G). Большое количество клеточных обломков может также иметь место при анализе образцов крови пациентов с некоторыми гематологическими нарушениями, при которых эритроциты лизируются с трудом (например, при миелофиброзе и сфероцитозе). Ядросодержащие эритроциты будут посчитаны как клеточные обломки. Если содержание обломков превышает 20 %, программное обеспечение помечает образец как «too many nonlymphs in gate» («слишком много нелимфоцитов в гейте») и результаты анализа отклоняются.
4. Оператор должен убедиться, что результат дифференцированного подсчета лейкоцитов BD Simultest IMK Plus отличается от результата независимого дифференцированного подсчета лейкоцитов не более чем на ± 10 %. Если результат подсчета BD Simultest IMK Plus лежит за пределами указанного диапазона, имеется расхождение и результаты тестирования следует признать сомнительными. Неверен либо результат дифференцированного подсчета лейкоцитов BD Simultest IMK Plus, либо результат независимого лабораторного дифференцированного подсчета лейкоцитов. См. раздел 9 «Ограничения».
5. Оператор должен проверить наличие согласованности процентного содержания Т-лимфоцитов между пробирками С, Е и F, содержащими CD3⁺. Тестирование должно быть забраковано, если значения общего количества Т-лимфоцитов в любых двух пробирках из трех различаются более чем на 8 %.

-
6. Лимфоциты хелперы/индукторы и супрессоры/киллеры не входят в общее количество Т-лимфоцитов, поскольку антиген CD8 также экспрессируется на НК-лимфоцитах. На внутреннюю однородность анализа указывает суммарное процентное содержание Т-, В-лимфоцитов и НК-лимфоцитов $100 \% \pm 5 \%$ при выборе программной опции Quadrant Correction (Коррекция квадрантов) в главном меню ПО BD Simultest IMK Plus. Инструкции по выбору этой опции см. в руководстве пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*.

См. также «Поиск и устранение неисправностей», раздел 12, в конце данного руководства пользователя.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Расчет скорректированного содержания

Если выбрана программная опция Quadrant Correction (Коррекция квадрантов), система BD FACScan с ПО BD Simultest IMK Plus автоматически рассчитывает процентную долю каждой подлежащей регистрации субпопуляции лимфоцитов от общего количества лимфоцитов в гейте сбора данных лимфоцитов. Программное обеспечение сначала вычитает не лимфоциты из квадранта 3 (Q3), а затем сообщает результаты как процентное содержание лимфоцитов в гейте сбора данных лимфоцитов, установленном с помощью пробирки BD Leucogate (A).

Если все критерии контроля качества, перечисленные в пункте «Контроль качества» раздела 7 «Процедура», соблюдены, программная опция Quadrant Correction (Коррекция квадрантов) выполняет соответствующие расчеты истинных значений субпопуляций. Однако если критерии контроля качества не соблюдены (например, из-за избыточной контаминации гейта не лимфоцитами), результаты могут быть сомнительными. В этом случае данные следует проанализировать вручную для определения влияния перекрестно реагирующих не лимфоцитов на результаты. Если опция Quadrant Correction (Коррекция квадрантов) отключена, результаты учитываются как процентная доля от суммы гейтированных событий. См. руководство пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*.

Принцип вычисления следующий (значения Q соответствуют результатам подсчета в квадрантах):

С помощью уравнения 1 рассчитывается процент событий лимфоцитов в гейте сбора данных лимфоцитов BD Leucogate. Это значение указано в табл. 1 как «% L» в пробирке А и отражает степень чистоты лимфоцитов в гейте, нарисованном с помощью пробирки BD Leucogate (А).

Табл. 1 Сводка репрезентативных данных, представленных на рисунке 2, и идентификация квадрантов, используемых для расчета субпопуляций

Пробирка	%L*	%M*	%G*	%D*	% от общего количества гейтированных лимфоцитов†
A (BD Leucogate)	95	1	3	1	99

Пробирка	Тип клеток	Квадрант(ы)	% лимфоцитов (после коррекции)	Отношение хелперов и супрессоров‡
C (CD3/CD19)	Всего Т-лимфоцитов	Q4	82	
	Всего В-лимфоцитов	Q1	9	
D (CD4/CD8)	Лимфоциты хелперы/индукторы; моноциты	Q2, Q4	50	1,2
	Т-лимфоциты супрессоры/киллеры и NK-лимфоциты	Q1, Q2	41	
E (CD3/Anti-HLA-DR)	Всего Т-лимфоцитов	Q4	81	
	Активированные Т-лимфоциты	Q2	18	
F (CD3/CD16+CD56)	Всего Т-лимфоцитов	Q4	81	
	NK-лимфоциты	Q1	7	

* %L, %M, %G и %D — это лимфоциты, моноциты, гранулоциты и клеточные обломки в гейте, определенном с помощью BD Leucogate, выраженные как процентные доли от всех событий в этом гейте. Эти значения отражают качество и степень чистоты гейта.

† Процент общего количества гейтированных лимфоцитов — это лимфоциты в гейте, определенном с помощью BD Leucogate, выраженные как процентная доля всех лимфоцитов в негейтированном образце. Это значение отражает долю всех лимфоцитов, включенных в гейт.

‡ Отношение хелперов и супрессоров = лимфоциты %CD4⁺ / лимфоциты %CD8⁺

N = суммарное количество событий в гейте лимфоцитов, определенное по формуле BD Leucogate = L + M + G + D, где:

L = количество лимфоцитов в гейте;

M = количество моноцитов в гейте;

G = количество гранулоцитов в гейте;

D = количество событий, связанных с клеточными обломками, в гейте.

Уравнение 1. Процент гейтированных лимфоцитов (%L) = $L/N \times 100$

Уравнение 2а. Процент гейтированных лимфоцитов после коррекции в Q1, Q2 или Q4 =

$$\frac{\text{Количество гейтированных событий в Q1, Q2 или Q4}}{N \times (\%L/100)} \times 100$$

В уравнении 2а процентные доли положительных клеток в каждом из трех положительных квадрантов (Q1, Q2 и Q4) выражаются как процентные доли лимфоцитов после коррекции, исходя из предположения, что все не лимфоциты в определенном с помощью BD Leucogate гейте — это неокрашенные клетки. Для расчета поправочного коэффициента в этих квадрантах ПО использует уравнение 2а для Q1, Q2 и Q4.

ПРИМЕЧАНИЕ Опция Quadrant Correction (Коррекция квадрантов) не делает поправки на события не лимфоцитов, которые могут возникнуть в Q1, Q2 и Q4. Поэтому программной поправки на CD4-положительные события моноцитов в Q4 нет.

В лабораторном отчете значения для неокрашенных клеток (Q3) приводятся под заголовком «Согг %L» как процентная доля лимфоцитов в Q3 после коррекции. В Q3 содержатся неокрашенные клетки и, предположительно, все события не лимфоцитов в гейте наряду с неокрашенными лимфоцитами. Поэтому в уравнении 2b результаты не только конвертируются из процентной доли всех событий в процентную долю лимфоцитов в гейте, но и из событий в гейте Q3 вычитаются гейтированные события не лимфоцитов.

Уравнение 2b. Процент гейтированных неокрашенных лимфоцитов после коррекции в Q3 (Corr %L) =

$$\frac{(\text{Количество гейтированных событий в Q3} - \text{Количество гейтированных не лимфоцитов}) \times 100}{N \times (\%L/100)}$$

где:

Количество гейтированных не лимфоцитов = количество гейтированных событий клеточных обломков + количество гейтированных гранулоцитов + количество гейтированных моноцитов. См. табл. 1, пробирка А.

Расчет абсолютного содержания

Абсолютное содержание клеток можно рассчитать в том случае, если содержание лейкоцитов и процентное содержание лимфоцитов в дифференцированном подсчете лейкоцитов получены с помощью стандартных лабораторных процедур. Проточный цитометр BD FACScan с ПО BD Simultest IMK Plus автоматически рассчитывает абсолютное количество для каждого параметра BD Simultest IMK Plus, если оператор вводит количество лейкоцитов и процентное содержание лимфоцитов из дифференцированного подсчета лейкоцитов для каждого образца цельной крови пациента. См. руководство пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*. Принцип расчета следующий:

1. Введите количество лейкоцитов, выраженное в лейкоцитах/мкл, полученное при анализе того же образца крови.
2. Введите процентное содержание лимфоцитов из лабораторного дифференцированного подсчета лейкоцитов, полученное для того же образца. Не используйте значения трехтипной лейкограммы, составленной ПО BD Simultest IMK Plus.

3. Затем рассчитываются абсолютные количества для каждой субпопуляции следующим образом:

Абсолютное количество клеток CD4⁺ / мкл =

$$\frac{\%CD4^{+}}{100} \times \frac{\%L}{100} \times (\text{лейкоцитов/мкл})$$

Если данные представлены в виде абсолютного содержания, значение и точность референсного диапазона абсолютного содержания являются функцией от а) лабораторного нормального референсного диапазона нормы и точности подсчета лейкоцитов, б) процентного содержания лимфоцитов и в) нормального референсного диапазона и точности процентного содержания лимфоцитов, положительных на определенный маркер.

Трехтипная лейкограмма

Для лизированной цельной крови имеется возможность определить процентную долю моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов от содержания лейкоцитов при помощи пробирки BD Leucogate A (см. табл. 2). Проточный цитометр BD FACScan с ПО BD Simultest IMK Plus автоматически рассчитывает трехтипную лейкограмму (табл. 2). Репрезентативные отчеты с данными приведены в руководстве пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*.

Таблица 2. Данные трехтипной лейкограммы с рис. 2

Трехтипная лейкограмма ^а	% лейкоцитов
Лимфоциты	25
Моноциты	5
Гранулоциты	70

- а. Трехтипная лейкограмма получается путем представления лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов во всем негетированном образце в виде процентной доли от суммарного количества лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов во всем образце.

ПРИМЕЧАНИЕ Дифференцированный подсчет, произведенный ПО BD Simultest IMK Plus, следует использовать только для сравнения с независимым дифференцированным подсчетом лейкоцитов в целях контроля качества и не следует использовать вместо независимого лабораторного дифференцированного подсчета лейкоцитов в картах пациентов, а также вводить в программное обеспечение BD Simultest IMK Plus для получения значений абсолютного содержания.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Используйте свежевзятую кровь и окрашивайте ее не позднее 6 часов после венопункции. Перед окрашиванием храните кровь при комнатной температуре (20–25 °C), поскольку клетки, охлажденные перед окрашиванием, могут давать искаженные результаты. Не рекомендуется использовать клетки, которые ранее фиксировались.
- Окрашенные и фиксированные клетки необходимо проанализировать не позднее 24 часов после окрашивания.
- Для образцов цельной крови с количеством лейкоцитов менее $3,5 \times 10^3$ в мкл и выше $9,8 \times 10^3$ в мкл необходима особая обработка в целях получения корректных результатов. Для образцов с количеством лейкоцитов выше $9,8 \times 10^3$ в мкл требуется разведение PBS, содержащим 0,1 % азида натрия. Для образцов с содержанием лейкоцитов менее $3,5 \times 10^3$ в мкл могут потребоваться большее количество крови и процедура сепарации для концентрирования клеток.

-
- Присутствие искажающих факторов, например приема лекарственных средств, влияющих на свойства клеток крови, может привести к получению неточных результатов. Например, недостаточное разделение положительных и отрицательных клеток наблюдается у пациентов с трансплантатами, получающих иммунодепрессанты. При недостаточном разделении отрицательных и положительных кластеров результаты тестирования следует забраковать (см. раздел 12 «Поиск и устранение неисправностей» в конце данного руководства пользователя). Если любые две пробирки из трех, содержащих CD3, различаются по общему процентному содержанию Т-лимфоцитов больше чем на 8 %, результаты тестирования следует забраковать.
 - В лабораториях должны быть установлены собственные референсные диапазоны для каждого параметра BD Simultest IMK Plus в зависимости от пола, возраста пациента и методики подготовки пробы. Расовая принадлежность пациента также может иметь значение, хотя отсутствуют достаточные данные для подтверждения этого факта. При определении референсных диапазонов следует учитывать возраст, пол, клиническое состояние и расовую принадлежность пациентов.
 - Если результаты должны быть выражены как абсолютное количество, необходим подсчет лейкоцитов и независимый дифференцированный подсчет лейкоцитов того же образца крови. Не используйте для подсчета абсолютного содержания лейкограмму из отчета программного обеспечения BD Simultest IMK Plus. Лейкограмма, составленная программным обеспечением BD Simultest IMK Plus, печатается только для сравнения с результатами независимого лабораторного дифференцированного подсчета лейкоцитов в целях контроля качества; ее не следует использовать вместо независимого лабораторного дифференцированного подсчета лейкоцитов в картах пациентов, а также вводить данные лейкограммы в программное обеспечение BD Simultest IMK Plus для подсчета абсолютного содержания.

-
- Если результаты дифференцированного подсчета лимфоцитов BD Simultest IMK Plus отличаются от результатов независимого дифференцированного подсчета лейкоцитов больше чем на $\pm 10\%$, имеется значительное расхождение и интерпретировать результаты подсчета абсолютного содержания следует с осторожностью. Неверен либо результат дифференцированного подсчета лейкоцитов BD Simultest IMK Plus, либо результат лабораторного дифференцированного подсчета лейкоцитов. См. пункт «Контроль качества» в разделе 7 «Процедура».
 - Отклонения автоматических или ручных настроек гейта сбора данных лейкоцитов влияют на относительное количество подвергшихся оценке субпопуляций. Программное обеспечение BD Simultest IMK Plus использует пробирку BD Leucogate (A), чтобы включить не менее 95 % общего количества лимфоцитов в образце в гейт сбора данных лимфоцитов, и требует визуальной проверки настроек гейта.
 - Отклонения от нормы состояния здоровья не всегда сопровождаются отклонениями от нормы процентного содержания Т- или В-лимфоцитов либо их субпопуляций. А именно, у человека с плохим состоянием здоровья могут наблюдаться такие же показатели процентного содержания Т- или В-лимфоцитов, что и у здорового человека. Результаты BD Simultest IMK Plus следует использовать вместе с данными других клинических наблюдений и независимых диагностических процедур.
 - Информация, полученная при использовании данного набора, должна использоваться в сочетании с прочей информацией и интерпретироваться квалифицированным врачом-диагностом для подтверждения наличия или отсутствия конкретных патологических состояний.

- Учтите, что нормальные референсные диапазоны, установленные компанией BD для отношения лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺ (хелперов и индукторов), включают значения ниже 1,0 (см. табл. 3 в пункте «Субпопуляции лейкоцитов» в разделе 10 «Ожидаемые значения»).
- Опция Quadrant Correction (Коррекция квадрантов) ПО BD Simultest IMK Plus подразумевает, что все не лимфоциты не окрашены. Поэтому CD4-положительные моноциты, попавшие в Q4, будут учтены как CD4-положительные лимфоциты. Если контаминация моноцитами превышает 4 %, образец помечается флажком. Дополнительную информацию о коррекции квадрантов см. в руководстве пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*.
- Учтите, что некоторые антитела BD Simultest IMK Plus реагируют с другими нелимфоцитарными форменными элементами крови. См. пункт «Перекрестная реактивность» в разделе 11 «Рабочие характеристики».
- Отношение Т-лимфоцитов хелперов и супрессоров, определенное компьютерной системой BD CONSORT 30 или BD CONSORT 32 с ПО BD Simultest IMK Plus, может варьироваться из-за изменений в различных субпопуляциях лимфоцитов CD8⁺, которые также положительны на CD16, CD56 или оба эти маркера. Исследования двойной флуоресценции с использованием обоих типов антител с CD8 позволяют определить, какие популяции ответственны за вариабельность.
- В образцах с ядросодержащими эритроцитами может наблюдаться неполный лизис, так как лизирующий раствор BD Simultest IMK Plus Lysing Solution (реагент G) может не лизировать ядросодержащие эритроциты. Это также может наблюдаться при анализе образцов крови пациентов с определенными гематологическими нарушениями, при которых эритроциты лизируются с трудом, например с миелофиброзом и сфероцитозом. Ядросодержащие эритроциты будут учтены как клеточные обломки. Если содержание клеточных обломков превышает 20 %, ПО помечает образец флажком «too many nonlymphs in gate»

(«слишком много нелимфоцитов в гейте»). Рекомендуется забраковать результаты анализа такого образца. Если выбран программный параметр Quadrant Correction (Коррекция квадрантов), подразумевается, что нелимфоциты, например ядросодержащие или нелизированные эритроциты, обнаруженные с помощью реагента BD Leucogate, не окрашены и вычтены ПО из Q3.

- ПО BD Simultest IMK Plus осуществляет проверку на не антиген-специфичное связывание антител только при анализе контрольной пробирки В. Оператор должен изучить распечатку на наличие признаков не антиген-специфичного связывания антител в последующих пробирках (от С до F). Например, если на изображении точечного графика пробирки С в Q2 слишком много событий, следует заподозрить наличие не антиген-специфичного связывания антител. Наличие такого не антиген-специфичного связывания антител может отражать изменение реагентов или ошибку при подготовке проб. Такие образцы следует обрабатывать заново.
- Наличие аномальных (бластных) клеток может препятствовать настройке правильного гейта сбора данных лимфоцитов BD Leucogate. Программное обеспечение пометит такой образец, и результаты не будут распечатаны.
- В образцах цельной крови продолжительное воздействие на клетки лизирующего раствора BD Simultest IMK Plus Lysing Solution (реагента G) — дольше 12 минут — может привести к разрушению лейкоцитов (см. пункт 4 в подразделе «Окрашивание и фиксация клеток» раздела 7 «Процедура»).
- Способность проточного цитометра выбирать лимфоциты и вычитать тромбоциты, эритроциты, клеточные обломки, гранулоциты и моноциты из количества лимфоцитов зависит от наличия четкой границы между этими форменными элементами крови и лимфоцитами на диаграмме зависимости SSC от FSC. Для некоторых пациентов четкой границы нет, и синхронизация по лимфоцитам менее эффективна.

- Рабочие характеристики установлены при использовании проточных цитометров BD FACScan. Рабочие характеристики с использованием любых других приборов не установлены.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Субпопуляции лейкоцитов

Для каждой пробирки выполняется четыре подсчета, в том числе для контрольной пробирки В. Результаты каждого подсчета представлены в отдельном квадранте на экране BD FACScan (рис. 2).

Клеточные популяции, присутствующие в каждом квадранте для каждой пробирки, показаны на рис. 3 в этом руководстве пользователя и в руководстве пользователя *BD Simultest IMK Plus User's Guide*.

Клинически значимые результаты приведены в клиническом отчете⁷¹. По данным компании BD среднее отношение лимфоцитов хелперов и супрессоров в периферической крови 304 здоровых мужчин и женщин в возрасте от 20 до 70 лет составляет 1,4, а 95%-й диапазон — от 0,6 до 2,8⁷¹.

Компания BD изучила нормальные референсные диапазоны для параметров реагента BD Simultest IMK Plus на здоровых мужчинах и женщинах с помощью проточного цитометра BD FACScan в шести центрах (пять клинических центров в Европе и один в США).

Ожидаемые нормальные референсные диапазоны для лизированной цельной крови (LWB) приведены в табл. 3⁷¹. Диапазоны представлены как процентное содержание лимфоцитов после коррекции.

Полученные референсные диапазоны были проверены на предмет различий между клиническими центрами, а также между пациентами разного пола и возраста. Для каждого параметра BD Simultest IMK Plus проводились непараметрические сравнения значений, полученных в каждом центре, значений, полученных для мужчин и женщин, и значений, полученных для участников в возрасте от 18 до 40 лет и для участников в возрасте от 41 до 70 лет. Если при сравнении обнаруживалось значимое различие, данные этих групп не

объединялись и приводились отдельные референсные диапазоны. Нормальный референсный диапазон для процентного содержания положительных клеток рассчитывается по эмпирически подобранному распределению⁷¹. Возможность объединения референсных диапазонов для параметров BD Simultest IMK Plus (табл. 3) является свидетельством межлабораторной воспроизводимости.

Существуют небольшие, но значимые различия между полами для диапазонов общего количества Т-лимфоцитов, определенного при помощи реагента F, и между полами и пациентами младше и старше 40 лет для Т-лимфоцитов хелперов/индукторов, отношения лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺, активированных Т-лимфоцитов и NK-лимфоцитов.

Таблица 3. Репрезентативные референсные диапазоны^а для параметров BD Simultest IMK Plus, полученные у гематологически здоровых взрослых пациентов, представленные как процентные доли от общего количества лимфоцитов (после коррекции) (объединенные данные из шести клинических центров)

Параметр	Пол	Возраст	n	Среднее значение (%)	95%-й диапазон ^б
Всего Т-лимфоцитов	Мужской	18–70	161	71,3	58,2–84,3
	Женский	18–70	143	73,9	62,8–85,0
Всего В-лимфоцитов	Оба	18–70	319	14,0	7,1–23,3
Лимфоциты хелперы/индукторы	Мужской	≤40	77	39,9	27,3–52,5
	Мужской	>40	84	43,9	28,5–59,2
	Женский	≤40	85	44,0	31,4–56,7
	Женский	>40	58	48,9	34,0–63,8
Лимфоциты супрессоры/киллеры	Оба	18–70	304	33,4	18,9–47,9
Отношение хелперов и супрессоров	Мужской	≤40	77	1,2	0,6–2,2
	Мужской	>40	84	1,5	0,6–3,0
	Женский	≤40	85	1,3	0,7–2,3
	Женский	>40	58	1,7	0,8–3,3

Таблица 3. Репрезентативные референсные диапазоны^а для параметров BD Simultest IMK Plus, полученные у гематологически здоровых взрослых пациентов, представленные как процентные доли от общего количества лимфоцитов (после коррекции) (объединенные данные из шести клинических центров)

Параметр	Пол	Возраст	n	Среднее значение (%)	95%-й диапазон ^б
Активированные Т-лимфоциты	Мужской	≤40	58	9,4	3,5–20,6
	Мужской	>40	67	11,0	3,6–25,9
	Женский	≤40	64	7,8	2,8–17,3
	Женский	>40	44	9,1	4,2–17,2
NK-лимфоциты	Мужской	≤40	80	13,2	5,4–27,1
	Мужской	>40	88	16,3	6,7–33,5
	Женский	≤40	91	12,3	4,8–26,1
	Женский	>40	60	13,6	6,0–26,7

- а. Эти данные были получены с использованием реагентов BD Simultest IMK Plus, программного обеспечения BD Simultest IMK Plus и проточного цитометра BD FACScan.
 б. 95%-й диапазон получен путем совмещения соответствующего распределения с данными с последующей оценкой центральных 95 % площади совмещенного распределения.

Референсные диапазоны, полученные для взрослых, неприменимы к педиатрическим образцам крови (от 0 до 13 лет). Предварительные результаты для 50 педиатрических образцов позволяют предположить, что общее процентное содержание В-лимфоцитов у детей немного выше, чем у взрослых. У детей младше года обычно наблюдалось значительно более низкое общее содержание Т-лимфоцитов.

Расовая принадлежность также может иметь значение для определения нормальных референсных диапазонов⁷², однако для подтверждения этой гипотезы у компании BD недостаточно данных. Компания BD представляет несколько верхних и нижних пределов диапазонов большинства параметров BD Simultest IMK Plus (табл. 3 на стр. 46) из-за наблюдаемых различий в зависимости от возраста и пола.

ПРИМЕЧАНИЕ Ожидаемые нормальные значения могут варьироваться в зависимости от возраста, пола и расовой принадлежности пациента. Вследствие данных различий в каждой лаборатории должны быть установлены собственные референсные диапазоны.

Абсолютное содержание

Система BD FACScan с ПО BD Simultest IMK Plus автоматически рассчитывает абсолютное количество, если данные о количестве лейкоцитов и дифференцированном процентном содержании лимфоцитов или абсолютном количестве лимфоцитов получены и введены в ПО.

ПРИМЕЧАНИЕ Не используйте значения трехтипной лейкограммы BD Simultest IMK Plus для получения значений абсолютного содержания. Дифференцированный подсчет, произведенный ПО BD Simultest IMK Plus, следует использовать только для сравнения с независимым дифференцированным подсчетом лейкоцитов в целях контроля качества и не следует использовать вместо независимого лабораторного дифференцированного подсчета лейкоцитов в картах пациентов, а также вводить в программное обеспечение BD Simultest IMK Plus для получения значений абсолютного содержания.

Абсолютные значения характеризуются значительной межлабораторной вариабельностью в зависимости от используемой методики подсчета лейкоцитов и дифференцированного подсчета лейкоцитов.

Репрезентативные абсолютные значения представлены в табл. 4. Данная таблица составлена на основе данных, собранных в Laboratoire d'Hématologie, Ecole de Santé Publique, Université Catholique de Louvain, Belgium (Бельгия) — центре с самой крупной одиночной популяцией пациентов от 20 до 70 лет. Эти пациенты представляют выборочную популяцию в возрасте от 20 до 70 лет, к которой был применен критерий $T + B + NK = 100 \pm 5 \%$. Параметры BD Simultest IMK Plus были выражены как процентное содержание лимфоцитов в гейте сбора данных лимфоцитов после вычитания не лимфоцитов (гранулоцитов, моноцитов и клеточных обломков) из квадранта 3.

Таблица 4. Репрезентативные референсные диапазоны^а для параметров BD Simultest IMK Plus у гематологически здоровых взрослых (данные об абсолютном содержании^б из одного клинического центра)

Параметр	Пол	Возраст	n	Среднее значение	95%-й диапазон ^с
Лейкоцитов	Оба	20–70	98	6,08 ^д	3,45–9,76
% лимфоцитов	Оба	20–70	98	30,96	20,7–44,6
Всего Т-лимфоцитов	Мужской Женский	20–70 20–70	40 55	1,31 1,39	0,594–1,992 0,772–2,201
Всего В-лимфоцитов	Оба	20–70	98	0,27	0,109–0,532
Лимфоциты хелперы/индукторы	Мужской Мужской Женский Женский	≤40 >40 ≤40 >40	11 29 27 28	0,77 0,82 0,86 0,86	0,439–1,112 0,356–1,351 0,309–1,571 0,496–1,354
Лимфоциты супрессоры/киллеры	Оба	20–70	95	0,58	0,282–0,999
Отношение хелперов и супрессоров	Мужской Мужской Женский Женский	≤40 >40 ≤40 >40	11 29 27 28	1,28 1,57 1,37 1,84	0,865–1,885 0,784–3,100 0,775–2,375 0,846–3,500
Активированные Т-лимфоциты	Мужской Мужской Женский Женский	≤40 >40 ≤40 >40	11 30 29 28	0,14 0,17 0,12 0,15	0,050–0,268 0,042–0,451 0,034–0,321 0,054–0,496
NK-лимфоциты	Мужской Мужской Женский Женский	≤40 >40 ≤40 >40	11 30 29 28	0,19 0,26 0,21 0,23	0,078–0,345 0,102–0,511 0,072–0,543 0,106–0,605

- а. Эти данные были получены с использованием реагентов BD Simultest IMK Plus, программного обеспечения BD Simultest IMK Plus и проточного цитометра BD FACScan.
- б. Абсолютное количество выражено в 1×10^3 клеток/мкл.
- с. 95%-й диапазон рассчитан непосредственно по данным с использованием процентилей 2,5 и 97,5.
- д. Данные были получены на автоматическом устройстве для подсчета клеток Technicon™ H6000. (Technicon является товарным знаком компании Miles Instruments.)

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Эффективность BD Simultest IMK Plus была установлена при тестировании в клиническом центре США, в лабораториях компании BD в городе Сан-Хосе, Калифорния, или в обоих.

Воспроизводимость внутри выборки

Образцы крови каждого из пяти здоровых и пяти больных доноров были получены и поделены на аликвоты (четыре раза для здоровых пациентов и три раза для больных), окрашены реагентами BD Simultest IMK Plus, лизированы и обработаны фиксирующим раствором в течение 2 часов после окрашивания. Анализ с использованием проточной цитометрии был проведен не позднее 24 часов на проточном цитометре BD FACScan в одной и той же лаборатории. В табл. 5 приведены усредненные данные воспроизводимости внутри выборки, полученные для здоровых и больных участников.

Воспроизводимость между приборами

С использованием протокола, аналогичного представленному выше, образцы цельной крови десяти здоровых участников были разделены на аликвоты, окрашены реагентами BD Simultest IMK Plus и лизированы. По одному образцу от каждого донора затем проанализировали на трех разных проточных цитометрах BD FACScan. Результаты приведены в табл. 6.

Воспроизводимость между лабораториями

О воспроизводимости между лабораториями свидетельствует возможность объединения нормальных референсных диапазонов для параметров BD Simultest IMK Plus (табл. 3 на стр. 46).

BD Simultest IMK Plus и сравнительные методы

Аликвоты одних и тех же образцов крови здоровых и больных участников были проанализированы с помощью реагентов BD Simultest IMK Plus, набора BD Simultest™ Immune Monitoring Kit, CD3 FITC и CD19 PE с использованием лизированной цельной крови (LWB) и проточного цитометра BD FACScan. Сравнение результатов выполнялось по линейной регрессии. Сводка результатов приведена в табл. 7.

Таблица 5. Воспроизводимость внутри выборки для параметров BD Simultest IMK Plus (пять здоровых пациентов и пять больных) как процентное содержание лимфоцитов (после коррекции)

Параметр	Пациенты	n	Среднее значение ^a (%)	SD ^b	CV ^c	df ^d
Всего Т-лимфоцитов	Здоровые	5	68,4	1,6	2,2	14 ^e
	Больные	5	80,4	1,9	2,0	15 ^e
Всего В-лимфоцитов	Здоровые	5	9,5	2,4	21,5	14
	Больные	5	9,3	1,0	9,0	15
Лимфоциты хелперы/индукторы	Здоровые	5	46,3	1,5	3,2	15
	Больные	5	18,8	2,1	12,2	15
Лимфоциты супрессоры/киллеры	Здоровые	5	34,8	1,3	3,6	15
	Больные	5	65,5	2,6	3,7	15
Отношение хелперов и супрессоров	Здоровые	5	1,4	0,1	5,2	15
	Больные	5	0,3	0,04	13,4	15
Активированные Т-лимфоциты	Здоровые	5	6,4	1,5	24,5	15
	Больные	5	38,9	1,6	4,3	15
NK-лимфоциты	Здоровые	5	24,7	2,0	7,0	14 ^e
	Больные	5	12,6	0,9	6,7	15

- a. Среднее значение — это объединенное среднее значение, $\bar{Y}$ = среднее значение отдельных средних значений.
b. SD = среднееквадратическое отклонение, объединенное среднееквадратическое отклонение.

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2 + \dots + (n_k - 1) \times s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$$

s_i^2 = отклонение i-го образца для $1 \leq i \leq k$.

k = количество образцов.

n = количество наблюдений в образце.

c. CV = коэффициент вариации

d. df = степени свободы = (количество реплицированных копий – количество средних значений доноров) × количество пациентов; 4 аликвоты – 1 среднее значение = 3 степени свободы. Три степени свободы для 5 пациентов = 15 степеней свободы, или 1 аликвота × 3 прибора – 1 среднее значение = 2 степени свободы. Две степени свободы для 10 пациентов = 20 степеней свободы.

e. Одна реплицированная копия была забракована врачом.

Таблица 6. Воспроизводимость между приборами для параметров BD Simultest IMK Plus (десять здоровых пациентов) как процентное содержание лимфоцитов (после коррекции)

Параметр	Среднее значение ^a (%)	SD ^b	CV ^c	df ^d
Всего Т-лимфоцитов	72,1	2,13	2,29	20
Всего В-лимфоцитов	12,7	1,26	10,59	20
Лимфоциты хелперы/индукторы	45,8	1,26	2,47	20
Лимфоциты супрессоры/киллеры	39,0	1,37	3,28	20
Отношение хелперов и супрессоров	1,2	0,06	4,80	20
Активированные Т-лимфоциты	11,8	1,56	14,09	20
НК-лимфоциты	16,8	1,28	6,93	20

- a. Среднее значение — это объединенное среднее значение, $\bar{Y}$ = среднее значение отдельных средних значений.
b. SD = среднееквадратическое отклонение, объединенное среднееквадратическое отклонение.

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2 + \dots + (n_k - 1) \times s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$$

s_i^2 = отклонение i-го образца для $1 \leq i \leq k$.

k = количество образцов.

n = количество наблюдений в образце.

c. CV = коэффициент вариации = $\frac{SD}{\bar{Y}} \times 100$

- d. df = степени свободы = (количество реплицированных копий – количество средних значений доноров) × количество пациентов; 4 аликвоты – 1 среднее значение = 3 степени свободы. Три степени свободы для 5 пациентов = 15 степеней свободы, или 1 аликвота × 3 прибора – 1 среднее значение = 2 степени свободы. Две степени свободы для 10 пациентов = 20 степеней свободы.

Стабильность окрашенных препаратов клеток

Препараты клеток пяти здоровых участников были получены и проанализированы на проточном цитометре BD FACScan. Препараты хранились при температуре 2–8 °С в темном помещении в течение 24 часов, затем был проведен повторный анализ методом проточной цитометрии. Исследование не выявило значимых различий между показателями дня 0 и дня 1 по какому-либо параметру. Рекомендуется анализировать окрашенные образцы в течение 24 часов.

Таблица 7. BD Simultest IMK Plus и сравнительный метод с использованием лизированной цельной крови (LWB) и проточного цитометра BD FACScan

Параметр	Кoeffи- циент	Свободный член	r	n ^a	Диапазон данных (%)
Всего Т-лимфоцитов ^b	0,98	4,06	0,98	58	10–90
Всего В-лимфоцитов ^c	0,97	1,47	0,99	65	0–80
Лимфоциты хелперы/индукторы	1,16	-1,81	0,96	31	10–60
Лимфоциты супрессоры/киллеры ^d	0,96	7,05	0,93	31	25–80
Отношение хелперов и супрессоров ^d	1,02	-0,02	0,98	31	0,125–2,0
Активированные Т-лимфоциты	1,06	0,34	0,92	27	5–50

a. Суммарно образцов здоровых и больных пациентов.

b. Определено при помощи CD3 FITC.

c. Определено при помощи CD19 PE.

d. По сравнению с набором BD Simultest Immune Monitoring Kit.

Перекрестная реактивность

Специфичность моноклональных антител с номером CD была установлена при слепом тестировании в нескольких лабораториях Международной группы по изучению лейкоцитов (International Leucocyte Workshop Group)^{25,27,34,38,42,64,65}.

Антитела CD4 реагируют с моноцитами, а также с лимфоцитами⁴⁷. Антитела Anti-HLA-DR реагируют с моноцитами/макрофагами, а также с В-лимфоцитами^{14,19,57–60}. Антитела CD14 реагируют с гранулоцитами, а также с моноцитами/макрофагами³³. Антитела CD16 слабо реагируют с нейтрофилами²⁰. Потенциально вызывающие помехи гранулоциты должны вычитаться из количества лимфоцитов с использованием их свойств светорассеяния.

Хотя контрольный реагент (реагент В) предназначен для обнаружения не антиген-специфичного связывания антител, неспецифическое связывание, вызванное плохим состоянием клеток, может наблюдаться с любым реагентом на основе антител. Вывод о наличии не антиген-специфичного связывания антител можно сделать, если не наблюдается четкого разделения отрицательных и положительных клеток на графике флуоресценции или если более 5 % событий для отрицательного контроля лежит за пределами квадранта 3. При наличии не антиген-специфичного связывания антител ознакомьтесь с «Поиск и устранение неисправностей», раздел 12, в конце данного руководства пользователя.

Линейность и восстановление

Все партии реагентов BD Simultest IMK Plus проходят титрование с реальными клеточными суспензиями, чтобы обеспечить оптимальные рабочие характеристики при $1,0 \times 10^6$ лейкоцитов/образец. Для образца лизированной цельной крови (LWB) нормальный диапазон составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл. Результаты должны быть линейными в диапазоне от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл.

12. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Недостаточное разделение положительной и отрицательной флуоресцентной популяции	- Пониженная флуоресценция в связи с неправильным напряжением ФЭУ или коэффициентом усиления усилителя. - Недостаточное количество реагента на основе антител.	- Провести анализ с помощью ПО BD Autocomp с гранулами BD Calibrite Beads. Результат должен соответствовать спецификациям по интенсивности в каналах флуоресценции. - Проверить калибровку дозатора, добавленный объем реагента, а также объем и концентрацию добавленных клеток. Проверить условия хранения реагента.
Не обнаружено разделение между кластерами клеточных обломков и лимфоцитов на точечном графике светорассеяния	- Присутствие избыточного количества тромбоцитов, ядросодержащих эритроцитов или нелизированных эритроцитов. - Неправильно установлен коэффициент усиления усилителя FSC. - Образец не окрашен в пределах 6 часов после забора. - Установлен слишком высокий или слишком низкий порог FSC.	- Провести повторное окрашивание свежего образца. Промыть клетки при более низкой скорости, например, при 100g в течение 15 минут при комнатной температуре (20–25 °C). - Скорректировать коэффициент усиления усилителя FSC таким образом, чтобы левый край кластера лимфоцитов начинался приблизительно на 50-м канале (256-канальная шкала). Это особенно важно при переходе от настройки/компенсации с помощью ПО BD Autocomp к определению цельной крови. См. соответствующее руководство пользователя или руководство по эксплуатации прибора. - Провести забор свежего образца для окрашивания. - Скорректировать FSC таким образом, чтобы было приблизительно 10 каналов клеточных обломков (256-канальная шкала).

Проблема	Возможная причина	Решение
Неоптимальные рабочие характеристики окрашивающего реагента на основе антител	• Образец не окрашен в пределах 6 часов после забора. • Гейт анализа, выбранный ПО, включал слишком большое количество событий не лимфоцитов. • Неправильно установлены маркеры флуоресценции.	1. Провести забор свежего образца для окрашивания. 2. Провести повторную обработку данных с использованием ПО BD CONSORT 30, BD LYSYS II или BD Simulset и настроить гейт вручную. ПРИМЕЧАНИЕ. Из узкого лимфоцитарного гейта могут быть исключены крупные лимфоциты, например НК-лимфоциты, лимфобласты. По возможности повторно проведите сбор данных образцов после оптимизации светорассеяния — корректировки SSC ФЭУ, коэффициента усиления усилителя FSC и порогового значения FSC для отделения кластеров лимфоцитов от клеточных обломков. См. соответствующее руководство пользователя ПО. 3. Провести повторную обработку данных с использованием ПО BD CONSORT 30, BD LYSYS II или BD Simulset и установить маркеры флуоресценции вручную.

Проблема	Возможная причина	Решение
ПО неспособно установить приемлемый гейт лимфоцитов	- Образец лимфопеничен. - Установлен слишком высокий или слишком низкий порог FSC. - Неправильно установлен коэффициент усиления усилителя FSC. - Образец не окрашен в пределах 6 часов после забора. - Неправильная настройка маркера в ПО.	- Сконцентрировать клетки при помощи метода градиента плотности или повторно получить большее количество событий, используя BD CONSORT 30 или BD LYSYS II. - Скорректировать FSC таким образом, чтобы было приблизительно 10 каналов клеточных обломков (256-канальная шкала). - Скорректировать коэффициент усиления усилителя FSC таким образом, чтобы левый край кластера лимфоцитов начинался приблизительно на 50-м канале (256-канальная шкала). Это особенно важно при переходе от настройки/компенсации с помощью ПО BD Autocomp к определениям цельной крови. См. соответствующее руководство пользователя. - Провести забор свежего образца для окрашивания. - Повторно получить данные с использованием BD CONSORT 30 или BD LYSYS II.
Неокрашенные клетки в окрашенном образце перемещаются за пределы маркера, установленного при анализе контрольной пробирки В, в Q4 или Q1	- Не антиген-специфичное связывание антител в связи с тем, что образец содержит нежизнеспособные или поврежденные клетки. - Не антиген-специфичное связывание антител, обусловленное рецепторами Fc.	- Провести забор свежего образца для окрашивания. - Проверить на наличие избыточной контаминации моноцитами, гранулоцитами или клеточными обломками гейта сбора данных лимфоцитов.

Проблема	Возможная причина	Решение
Тусклое или непоследовательное окрашивание	- Концентрация клеток слишком велика на этапе окрашивания. - Недостаточно реагента. - Клетки не проанализированы в течение 24 часов после окрашивания. - Неправильно приготовлена среда (не добавлен азид натрия).	1. Проверить и скорректировать концентрацию клеток; провести повторное окрашивание свежего образца. 2. Повторить окрашивание с надлежащим количеством реагента. 3. Повторить окрашивание на свежем образце; проанализировать его немедленно. 4. На стадиях окрашивания и промывки использовать азид натрия.
Мало или нет клеток	- Концентрация клеток слишком мала. - Неисправность проточного цитометра.	1. Ресуспендировать свежий образец при более высокой концентрации. Повторить окрашивание и анализ. 2. Устранить неисправность прибора.
Повышенная аутофлуоресценция	- Возможная бактериальная контаминация PBS или фиксатора. - Плохая подготовка образца.	1. Приготовить свежеразведенный PBS в воде для анализа и свежий фиксатор. Профильтровать PBS и фиксатор через фильтр с ячейками 0,2 мкм. 2. Провести забор свежего образца и окрасить его.
Слабая положительная флуоресценция	Возможная бактериальная контаминация PBS или фиксатора. Ненадлежащий pH буфера или фиксатора.	Приготовить свежий PBS в воде для анализа и свежий фиксатор с PBS и азидом натрия. Довести до надлежащего значения pH. Профильтровать через фильтр с ячейками 0,2 мкм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Wolde-Mariam W, Peter J. Recent diagnostic advances in cellular immunology. *Diagnost Med.* 1984;7:25-32.
- 2 Henry C. Hemolytic plaque assays. In: Mishell B, Shiigi S, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. New York: WH Freeman and Co; 1980:69-123.
- 3 Grabstein K, Chen Y. Cell-mediated cytolytic responses. In: Mishell B, Shiigi S, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. New York: WH Freeman and Co; 1980:124-137.
- 4 Wofsy L, Henry C, Kimura J, North J. Modification and use of antibodies to label cell surface antigens. In: Mishell B, Shiigi S, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. New York: WH Freeman and Co; 1980:287-304.
- 5 Jackson A, Warner N. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose N, Friedman H, Fahey J, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
- 6 Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newsletter*. 1990;10:43-55.
- 7 Nicholson J, Jones B. Immunophenotyping by flow cytometry: its use in HIV infection. *Labmedica*. 1989;6:21-26.
- 8 Landay A, Muirhead K. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;52:48-60.
- 9 Schmidt R. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
- 10 Ohno T, Kanoh T, Suzuki T, et al. Comparative analysis of lymphocyte phenotypes between carriers of human immunodeficiency virus (HIV) and adult patients with primary immunodeficiency using two-color immunofluorescence flow cytometry. *Tohoku J Exp Med*. 1988;154:157-172.
- 11 Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8⁺ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol*. 1986;137:3436-3439.
- 12 Smolen J, Chused T, Leiserson W, Reeves J, Alling D, Steinberg A. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: Correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
- 13 Legendre C, Schiffrin A, Weitzner G, Colle E, Guttman R. Two color flow cytometry analysis of activated T-lymphocyte subsets in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes*. 1988;37:792-795.
- 14 Tomkinson B, Wagner D, Nelson D, Sullivan J. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J Immunol*. 1987;139:3802-3807.
- 15 Bishop G, Hall B, Duggin G, Horvath J, Sheil A, Tiller D. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Internat*. 1986;29:708-717.

- 16 Lanier L, Le A, Phillips J, Warner N, Babcock G. 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.
- 17 Giorgi J, Hultin L. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newsletter.* 1990;10:55-63.
- 18 Gratama J, Naipal A, Oijans P, et al. T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation: Early shifts in the ratio between T4⁺ and T8⁺ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Blood.* 1984;63:1416-1423.
- 19 Stites D, Casavant C, McHugh T, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopath.* 1986;38:161-177.
- 20 Lanier L, Le A, Civin C, Loken M, Phillips J. 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.
- 21 Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. In: Ades E, Lopez C, eds. *Natural Killer Cells and Host Defense.* Basel: Karger; 1989:1.
- 22 Aiuti F, Sirianni M, Mezzaroma I, et al. HIV-1 infection: epidemiological features and immunological alterations during the natural history of the disease. *Clin Immunol Immunopath.* 1989;50:S157-S165.
- 23 Jandl J. Blood and blood forming tissues. In: Jandl J, ed. *Blood Textbook of Hematology.* Boston, Mass: Little Brown and Company; 1987:1-48.
- 24 Beverley P. Production and use of monoclonal antibodies in transplantation immunology. In: Touraine J, Trager J, Betuel H, et al, ed. *Transplantation and Clinical Immunology XI.* Amsterdam: Excerpta Medica; 1980:87-94.
- 25 Cobbold S, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael A, Beverley P, Cobbold S, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1986:788-803.
- 26 Rowe D, Beverley P. Characterisation of breast cancer infiltrates using monoclonal antibodies to human leucocyte antigens. *Br J Cancer.* 1984;49:149-159.
- 27 Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: M2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman S, eds. *Leucocyte Typing.* Berlin: Springer-Verlag; 1984:82-108.
- 28 Dimitriu-Bona A, Burmester G, Waters S, Winchester R. 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.
- 29 Herrmann F, Komischke B, Odenwald E, Ludwig W. 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.

-
- 30 Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
- 31 Goyert S, Tesio L, Ashman L, et al. Report on the CD14 Cluster Workshop. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:789-794.
- 32 Bernstein I, Self S. Joint report of the myeloid section of the Second International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Human Myeloid and Hematopoietic Cells*. New York: Springer-Verlag; 1984:1-25.
- 33 Jayaram Y, Hogg N. Surface expression of CD14 molecules on human neutrophils. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:796-797.
- 34 Haynes B. Summary of T cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York: Springer-Verlag; 1986:3-30.
- 35 Ledbetter J, Evans R, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good R, Herzenberg L. 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.
- 36 Kan E, Wang C, Wang L, Evans R. Non-covalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti-Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
- 37 Knowles R. Immunochemical analysis of the T cell-specific antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York: Springer-Verlag; 1986:259-288.
- 38 Nadler L. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and comments. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York: Springer-Verlag; 1986:3-43.
- 39 van Dongen J, Krissansen G, Wolvers-Tettero I, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
- 40 Lanier L, Federspiel N, Ruitenberg J, et al. The T cell antigen receptor complex expressed on normal peripheral blood CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes. *J Exp Med*. 1987;165:1076-1094.
- 41 Dorken B, Moller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1986:34-36.
- 42 Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausett J, Milstein C, Schlossman S, eds. *Leucocyte Typing*. Berlin: Springer-Verlag; 1984:25-60.

-
- 43 Evans R, Wall D, Platsoucas C, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: Inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to the TH2 antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.
 - 44 Maddon P, Dalgleish A, McDougal J, Clapham P, Weiss R, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986;47:333-348.
 - 45 Dalgleish A, Beverly P, Clapham P, Crawford D, Greaves M, Weiss R. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS virus. *Nature*. 1984;312:763-767.
 - 46 Kurrel R. Cluster report: CD3. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:290-293.
 - 47 Wood G, Warner N, Warnke R. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol*. 1983;131:212-216.
 - 48 Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman S. Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *J Immunol*. 1987;139:678-682.
 - 49 Eichmann K, Johnson J-I, Falk I, Emmrich F. Effective activation of resting mouse T lymphocytes by cross-linking submitogenic concentrations of the T cell antigen receptor with either Lyt-2 or L3T4. *Eur J Immunol*. 1987;17:643-650.
 - 50 Gallagher P, Fazekas de St. Groth B, Miller J. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:10044-10048.
 - 51 Rudd C, Burgess K, Barber E, Schlossman S. Monoclonal antibodies to the CD4 and CD8 antigens precipitate variable amounts of CD4/CD8-associated p56^{lck} activity. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
 - 52 Terry L, Disanto J, Small T, Flomenberg N. Differential expression of the CD8 and Lyt-3 antigens on a subset of human T-cell receptor γ/δ -bearing lymphocytes. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:345-346.
 - 53 Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
 - 54 Lampson L, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol*. 1980;125:293-299.
 - 55 Brodsky F. A matrix approach to human Class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes. *Immunogenetics*. 1984;19:179-194.
 - 56 Robbins P, Evans E, Ding A, Warner N, Brodsky F. Monoclonal antibodies that distinguish between Class II antigens (HLA-DP, DQ, and DR) in 14 haplotypes. *Hum Immunol*. 1987;18:301-313.
 - 57 Terstappen L, Hollander Z, Meiners H, Loken M. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol*. 1990;48:138-148.
 - 58 Warnke R, Levy R. Detection of T and B antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem*. 1980;28:771-776.

-
- 59 Engleman E, Warnke R, Fox R, Dilley J, Benike C, Levy R. Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:1791-1795.
- 60 Edwards J, Durant B, Jones D, Evans P, Smith J. Differential expression of HLA Class II antigens in fetal human spleen: relationship of HLA-DP, DQ, and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol*. 1985;137:490-498.
- 61 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.
- 62 Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol*. 1983;130:2142-2148.
- 63 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.
- 64 Schmidt R. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
- 65 Schubert J, Lanier L, Schmidt R. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
- 66 Knapp W, Rieber P, Dörken B, Schmidt R, Stein H, van dem Borne A. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol Today*. 1989;10:253-258.
- 67 Lanier L, Testi R, Bindl J, Phillips J. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989;169:2233-2238.
- 68 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
- 69 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.
- 70 *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard—Sixth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
- 71 Reichert T, DeBruyere M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
- 72 Prince H, Hirji K, Waldbeser L, Plaeger-Marshall S, et al. Influence of racial background on the distribution of T cell subsets and Leu-11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diag Immunol*. 1985;3:33-37.

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 ЦЕЛЮ 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.



BD FACS™ Lysing Solution

100 мл — номер по каталогу 349202

4/2019

23-13689-09



BD, логотип BD, FACS, Simultest и Tritest являются товарными знаками компании Becton, Dickinson and Company или ее аффилированных лиц. Все остальные товарные знаки принадлежат соответствующим владельцам. © BD, 2019. Все права защищены.



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

Symbols glossary website:
<http://www.bd.com/symbols-glossary>

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution предназначен для лизирования эритроцитов после прямого иммунофлуоресцентного окрашивания клеток периферической крови человека моноклональными антителами перед анализом методом проточной цитометрии.

Лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution предназначен для использования с такими реагентами, как BD Tritest™ или BD Simultest™, и соответствующим образом оснащенным проточным цитометром. Его можно использовать с методикой лизирования с отмывкой или без отмывки.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Эффективное обнаружение лимфоцитов в периферической крови зависит от исключения мешающих клеток. Показано, что при подготовке мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) к анализу субпопуляций лимфоцитов лизирование цельной крови не менее эффективно, чем центрифугирование в градиенте плотности¹⁻⁴. В клинических лабораториях методы лизирования цельной крови практически вытеснили разделение в градиенте плотности Ficoll-Paque™1 благодаря сокращению времени подготовки образцов и необходимости обращения с цельной кровью⁵. Результаты исследований также показали, что при применении метода лизирования цельной крови менее вероятна потеря субпопуляций лимфоцитов и более высокая воспроизводимость результатов по сравнению с более ранними методами⁵⁻⁷.

1 Ficoll-Paque является товарным знаком компании GE Healthcare.

3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

При добавлении цельной крови к реагенту моноклональных антител меченные флуорохромом антитела в реагенте селективно связываются с поверхностными антигенами лейкоцитов. Окрашенные образцы затем обрабатываются слегка гипотоническим лизирующим раствором BD FACS Lysing Solution, который лизирует эритроциты, но не оказывает воздействия на лейкоциты.

4. РЕАГЕНТ

Поставляемый реагент

Лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution, 10-кратный концентрат, поставляется в виде 100 мл запатентованного буферного раствора, содержащего <10 % формальдегида и <50 % диэтиленгликоля. Данного

количества достаточно для проведения 2000 тестов при использовании методики лизирования без отмывки BD (например, BD Tritest) и для проведения 500 тестов при использовании методики лизирования с отмывкой (например, BD Simultest).

Меры предосторожности

- Только для диагностики in vitro.

Лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution содержит 25 – <50 % 2,2'-оксибисэтанола (диэтиленгликоля), номер CAS 111-46-6; 5 – <10 % формальдегида, номер CAS 50-00-0 и 3 – <5 % метанола, номер CAS 67-56-1. Лизирующий раствор считается опасным согласно Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ (СГС). Загрузите паспорт безопасности материала с сайта regdocs.bd.com.

	Опасность
 	H302+H312+H332: наносит вред при проглатывании, при контакте с кожей и при вдыхании. H315: вызывает раздражение кожи. H319: вызывает серьезное раздражение глаз. H317: может вызывать аллергическую кожную реакцию. H341: предположительно вызывает генетические дефекты. H350: может вызывать рак. H371: может нанести вред органам. H335: может вызывать раздражение дыхательных путей. H373: может наносить вред органам в результате длительного или многократного воздействия. P201: получить специальные инструкции перед использованием. P202: не использовать до тех пор, пока не прочтаете и не поймете все инструкции и меры безопасности. P260: не вдыхайте пыль / дым / газ / туман / пары / вещество в распыленном состоянии. P264: после работы тщательно вымыться. P272: не выносить загрязненную одежду с места работы. P280: пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз/лица. P333+P313: в случае раздражения кожи или появления сыпи обратиться к врачу. P337+P313: если раздражение глаз не проходит, обратиться к врачу. P304+P340: ПРИ ВДЫХАНИИ вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении. P312: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР / к врачу при плохом самочувствии. P308+P313: в случае воздействия или беспокойности обратиться к врачу.

В США в дополнение к показанным выше предупреждениям применяются следующие.

	Опасность
 	H402: вредно для водных организмов. P271: использовать только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении. P273: не допускать попадания в окружающую среду. P270: не принимать пищу, не пить и не курить в процессе использования этого продукта. P281: использовать необходимые средства индивидуальной защиты. P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА осторожно промывать водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P302+P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ промыть большим количеством воды. P301+P312: ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР / к врачу при плохом самочувствии. P330: прополоскать рот. P321: специальные меры (см. на этом маркировочном знаке). P363: постирать загрязненную одежду перед последующим использованием. P405: хранить в закрытом помещении. P403: хранить в хорошо вентилируемом месте. P233: держать крышку контейнера плотно закрытой. P501: утилизировать содержимое/контейнер на подходящем объекте по обработке и утилизации отходов в соответствии с применимыми законами и постановлениями и характеристиками продукта на момент утилизации.

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.

Инструкции по разбавлению

Разбавьте 10-кратный концентрат деионизированной водой комнатной температуры (20–25 °C) в отношении 1:10. Готовый раствор стабилен в течение 1 месяца при условии хранения в контейнере из стекла или полиэтилена высокой плотности (HDPE) при комнатной температуре.

5. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution (10-кратный) стабилен при соблюдении условий хранения до истечения срока годности, указанного на флаконе. Не используйте данный реагент в случае изменения цвета или выпадения осадка.

6. ПРИБОР

Лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution предназначен для использования с проточными цитометрами, оснащенными соответствующим компьютерным оборудованием и программным обеспечением. Проточный цитометр должен быть оснащен для обнаружения прямого светорассеяния (FSC) и бокового светорассеяния (SSC). Рекомендуется использовать проточные цитометры BD FACSCalibur™, BD FACSCanto™ и BD FACSCanto™ II. Однако результаты можно получить и при использовании других платформ. Ограничения для конкретных приборов см. в руководстве по использованию соответствующего реагента.

7. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Проведите забор крови асептически с помощью венопункции^{10,11} в стерильную пробирку с ЭДТА для забора крови BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube. Следуйте указаниям производителя пробирки относительно минимального объема крови, подлежащего забору. До готовности к окрашиванию и лизированию храните кровь с антикоагулянтom при комнатной температуре (20–25 °C). Условия хранения перед окрашиванием см. в руководстве по использованию соответствующего реагента. Возможные условия, мешающие проведению анализа, см. в разделе 10 «Ограничения».

8. ПРОЦЕДУРА

Поставляемый реагент

Лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution, 10-кратный концентрат (номер по каталогу 349202).

Необходимые, но не поставляемые реагенты и вещества

- неконцентрированный лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution, разбавленный в соответствии с указаниями в разделе 4 «Реагент: Инструкции по разбавлению»;
- пробирки с ЭДТА для забора крови BD Vacutainer EDTA Blood Collection Tubes или аналогичные;
- одноразовые полистирольные пробирки 12 × 75 мм с крышками;
- моноклональные антитела к антигенам лейкоцитов человека BD (например, реагенты BD Tritest или BD Simultest);
- мешалка «вортекс»;
- микропипетка с наконечниками.

Могут понадобиться и другие материалы. Дополнительную информацию см. в руководстве по использованию соответствующего реагента.

Подготовка образцов

Окрасьте образцы цельной крови в соответствии с инструкциями в руководстве по использованию соответствующего реагента. Лизируйте эритроциты в соответствии с указаниями, используя разбавленный (неконцентрированный) лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution. Пробирки необходимо защищать от прямого света. Проводите процедуру при комнатной температуре (20–25 °C).

1. Для каждого образца добавляйте в пробирку надлежащее количество конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител и крови, как указано в соответствующем руководстве по использованию.

2. Инкубируйте пробирки в соответствии с указаниями.
3. Внесите в пробирки надлежащий объем неконцентрированного лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution в соответствии с указаниями. Тщательно встряхните на «вортексе».
4. Продолжайте выполнять инструкции из соответствующего руководства по использованию, пока клетки не будут готовы к анализу на проточном цитометре. Закройте пробирки крышками и храните в темноте при температуре 2–8 °C до анализа на проточном цитометре. Окрашенные клетки необходимо проанализировать за время, указанное в соответствующем руководстве по использованию. Тщательно перемешайте клетки на «вортексе» при низкой скорости, чтобы снизить агрегацию перед анализом.

9. РЕЗУЛЬТАТЫ

Нижеприведенные репрезентативные данные были получены на образцах периферической крови, обработанных лизирующим раствором BD FACS Lysing Solution, на проточном цитометре BD FACScan™. Цельная кровь была окрашена реагентом BD Tritest™ CD3/CD4/CD45 (рис. 1) или реагентом BD Simultest™ CD3/CD4 (рис. 2).

Рис. 1. Точечные графики зависимости SSC от CD45 и CD4 от CD3, полученные при окрашивании реагентом BD Tritest

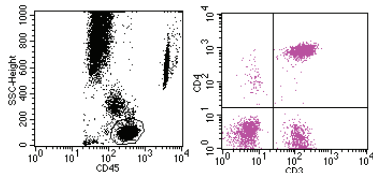
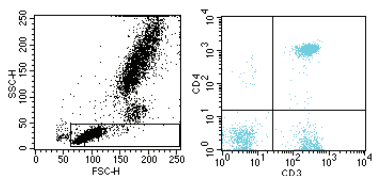


Рис. 2. Точечные графики зависимости SSC от FSC и CD4 от CD3, полученные при окрашивании реагентом BD Simultest



10. ОГРАНИЧЕНИЯ

- В лабораториях должны быть установлены собственные референсные диапазоны для параметров каждого реагента в зависимости от пола, возраста пациента и методики подготовки образца. Расовая принадлежность пациента также может иметь значение¹², хотя данных, чтобы утверждать это с полной уверенностью, недостаточно. При определении референсных диапазонов следует учитывать возраст, пол, клиническое состояние и расовую принадлежность пациентов¹³. Референсные диапазоны приводятся только для сведения.
- Лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution разработан специально для использования с проточными цитометрами BD FACScan™.

- Предпочтительный антикоагулянт — ЭДТА. Компания BD обладает ограниченной информацией об использовании других антикоагулянтов, например гепарина.
- До окрашивания и лизирования храните образцы в пробирках с ЭДТА для забора крови BD Vacutainer EDTA Blood Collection Tubes при комнатной температуре (20–25 °C). Максимальное время хранения образцов после сбора см. в руководстве по использованию реагента.
- В образцах с наличием ядросодержащих эритроцитов может наблюдаться неполный лизис ядросодержащих эритроцитов, поскольку лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution не лизирует ядросодержащие эритроциты. Это может также иметь место при анализе образцов крови пациентов с некоторыми гематологическими нарушениями, при которых эритроциты лизируются с трудом, например при миелодисплазии, серповидноклеточной анемии, талассемии и сфероцитозе^{7,8}.
- При использовании моноклональных реагентов, которые реагируют с сывороточными иммуноглобулинами, образцы крови перед окрашиванием и лизированием необходимо отмывать неконцентрированным физиологическим раствором, содержащим фосфатный буфер (PBS), или физиологическим раствором¹⁴.
- Моноклональный реагент, направленный против антигена или рецептора клеточной поверхности, который: а) сбрасывается в плазму (например, рецептор IL-2) или б) занят компонентами плазмы (например, рецепторы комплемента), при анализе с использованием методики лизирования цельной крови может окрашиваться менее интенсивно.

11. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В трех клинических центрах были исследованы здоровые взрослые, чтобы установить референсные диапазоны для субпопуляций лимфоцитов CD3⁺ и CD3⁺CD4⁺. Референсные диапазоны для изученных параметров представлены в следующей таблице. Полученные референсные диапазоны были проверены на предмет различий между центрами, а также пациентами разного пола и возраста. Если при сравнении обнаруживалось существенное различие, указывались отдельные референсные диапазоны.

Субпопуляция лимфоцитов	Пол	Возраст	n	Среднее значение	Диапазон 95 %
% CD3 ⁺	Оба	18–70	160	72	59–85
% CD3 ⁺ CD4 ⁺	Мужской	18–70	84	43	29–57
	Женский	18–70	75	46	31–60

Референсные диапазоны, полученные для взрослых, неприменимы к педиатрическим образцам крови (от 0 до 13 лет). Дополнительную информацию о референсных диапазонах см. в первом ограничении.

12. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точность

Для реагента BD Tritest (CD3/CD4/CD45) в двух клинических центрах были получены образцы от 17 здоровых и 61 больного донора. Три аликвоты каждого образца были окрашены, лизированы и обработаны на проточных цитометрах BD FACScan.

Паци- енты	Субпопуля- ция лимфо- цитов	n	Сред- нее- значе- ние	SD ^a	df ^b
Здоровые	%CD3 ⁺	17	72	0,72	34
	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	17	42	0,79	34
Больные	%CD3 ⁺	61	77	0,88	122
	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	61	19	0,61	122

a. SD = среднееквадратическое отклонение

b. df = степени свободы: количество наблюдений (3) минус количество средних значений (1), умноженное на количество пациентов (n).

Для реагента BD Simultest (CD3/CD4) в одном клиническом центре была проведена оценка воспроизводимости в пределах образца. Определения проводились на образцах крови шести здоровых и четырех больных пациентов (ВИЧ и трансплантация почки). Две аликвоты одного и того же образца крови были приготовлены с использованием панели реагентов BD Simultest™ IMK Lymphocyte, и каждая аликвота была дважды проанализирована в одном и том же проточном цитометре BD FACScan.

Паци- енты	Субпопуля- ция лимфо- цитов	n	Сред- нее- значе- ние ^a	SD ^b	df ^c
Здоровые	%CD3 ⁺	6	73	0,85	12
	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	6	46	1,08	12
Больные	%CD3 ⁺	4	83	0,77	8
	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	4	32	1,06	8

- a. Среднее значение — это объединенное среднее значение (среднее значение отдельных средних значений).
- b. SD = среднееквадратическое отклонение
- c. df = степени свободы: количество наблюдений (4) минус количество средних значений (2), умноженное на количество пациентов (n).

Восстановление лейкоцитов

Пять образцов крови были обработаны лизирующим раствором BD FACS Lysing Solution, отмыты и проанализированы на восстановление лейкоцитов при помощи гематологического анализатора Ortho ELT-1500 Clinical Hematology Analyzer. По сравнению с общим количеством лейкоцитов восстановление лейкоцитов при использовании лизирующего раствора в среднем составляло 92 %.

Лизирование эритроцитов

Пять образцов крови были обработаны лизирующим раствором BD FACS Lysing Solution, отмыты и проанализированы на остаточные эритроциты при помощи гематологического анализатора Ortho ELT-1500 Clinical Hematology Analyzer. Эритроцитов обнаружено не было.

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 содержания, 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 УЩЕБЬ ИЛИ ЛЮБЫЕ СЛУЧАЙНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ, включая травмы или экономические потери, вызванные изделием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. de Paoli P, Reitano M, Battistin S, Castiglia C, Santini G. Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometry: a comparative study using whole blood or mononuclear cells separated by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods*. 1984;72:349-353.
2. Ashmore LM, Shopp GM, Edwards BS. Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods*. 1989;118:209-215.
3. Renzi P, Ginns LC. Analysis of T cell subsets in normal adults: comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1987;98:53-56.
4. Romeu MA, Mestre M, González L, et al. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults: comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods*. 1992;154:7-10.
5. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:49-55.
6. Kidd PG, Vogt RF, Jr. Report of the workshop on the evaluation of T-cell subsets during HIV infection and AIDS. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;52:3-9.
7. Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopath*. 1989;52:48-60.
8. 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.
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. *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.
11. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
12. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 1985;3:33-37.
13. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. CLSI document EP28-A3c.
14. Nicholson JK, Rao PE, Calvelli T, et al. Artifactual staining of monoclonal antibodies in two-color combinations is due to an immunoglobulin in the serum and plasma. *Cytometry*. 1994;18:140-146.