Комплект для подсчёта LeukoSure

Для подсчёта белых клеток крови в пробах крови со сниженным числом лейкоцитов

REF 175621 - 200 тестов
REF 6607124 - 200 тестов

Ч.№ 175624-EE

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект для подсчёта LeukoSure состоит из набора реагентов, используемых для подготовки и подсчёта с помощью проточной цитометрии белых клеток крови в пробах красных клеток крови и тромбоцитов с пониженным числом лейкоцитов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Для предотвращения разнообразных опасных последствий переливания крови, продукты крови, содержащие красные клетки крови (RBC) и тромбоциты обрабатываются для удаления белых клеток крови (WBC).[1] На настоящий момент допустимым уровнем остаточных WBC считается менее 3,3 WBC/µL на единицу упаковки крови в 300 mL.[2, 3] Большинство стандартных методов подсчёта не регистрирует такие значения.[4] Комплект для подсчёта LeukoSure создан для использования чувствительности проточной цитометрии для подсчёта остаточных лейкоцитов на уровне значений, необходимом для обеспечения контроля качества крови со сниженным числом лейкоцитов.[5, 6]

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Образец лизируется и проводится через процедуру повышения проницаемости мембран с использованием лизирующего реагента LeukoSure для уничтожения красных клеток крови и подготовки клеток для последующего добавления красящего реагента LeukoSure, содержащего йодид пропидия и РНКазу (для удаления рибонуклеиновой кислоты, или РНК). В отсутствие РНК, йодид пропидия связывается только с двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), таким образом, что ядросодержащие клетки в пробе флуоресцируют с интенсивностью, пропорциональной содержанию в них ДНК. Проточный цитометр измеряет флуоресценцию каждой помеченной клетки по мере ее прохождения сквозь лазерный луч. Так как зрелые тромбоциты и красные клетки крови не содержат ДНК, помеченные клетки будут представлять лейкоцитарный компонент крови.

Метод подсчёта зависит от смешивания пробы флуоросфер LeukoSure известного объёма (100 µL) и концентрации с равным объёмом тестируемой пробы. После анализа проводится абсолютный подсчет образца, дающий абсолютное число лейкоцитов в пробе.

ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ РЕАКТИВЫ

Копмлект для подсчёта LeukoSure
REF 175621 (200 тестов)

Лизирующий реагент LeukoSure, 1 x 20 mL

Красящий реагент LeukoSure, 2 x 70 mL

Флуоросферы LeukoSure, 1 x 20 mL

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Лизирующий реагент LeukoSure содержит <0,1% цианида калия, <0,1% NaN_3, неионогенные детергенты, физиологический раствор и стабилизаторы.

Красящий реагент LeukoSure содержит 50 µg/mL йодида пропидия (<0,5% йодида пропидия), РНКазу [Тип III-A, бычья поджелудочная железа] (4 KU/mL), <0,1% NaN_3, физиологический раствор и стабилизаторы.

Флуоросферы LeukoSure состоят из 10 µm (номинальный диаметр) полистироловых флуоросфер в среде для водной суспензии, содержащей сурфактант и 1% формальдегид. Аналитическая концентрация флуоросфер LeukoSure получена по результатам многочисленных повторных анализов на анализаторе размеров частиц COULTER Model Z 1/Z2.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Йодид пропидия	Возбуждается светом длиной волны 488 nm Светоизлучает на длине волны 560-630 nm.
Флуоросферы LeukoSure	Светоизлучает на длине волны 525-700 nm. Возбуждается светом длиной волны 488 nm

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ



ОПАСНО

Формальдегид <3%
Вызывает раздражение кожи.
Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
Вызывает тяжелое раздражение глаз.
Подозрение на образование генетических дефектов.
Может вызвать рак.
Получить специальные инструкции перед использованием.
Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения/лица.
ПРИ воздействии или подозрении на таковое: обратиться за медицинской помощью.
Снять загрязненную одежду и постирать перед использованием.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs.***

1. Красящий реагент LeukoSure содержит йодид пропидия. Йодид пропидия является мутагеном и, предположительно, канцерогеном, и при работе с ним следует соблюдать все меры предосторожности. При работе с этим реагентом следует всегда носить непроницаемые для жидкостей перчатки.
2. Лизирующий реагент LeukoSure содержит цианид калия. Контакт этого реагента с кислотой может привести к высвобождению ядовитого газа. Избегайте контакта с кислотой.
3. Красящий и лизирующий реагенты LeukoSure содержат азид натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. Во время утилизации соединения азида следует смывать проточной водой. Рекомендуется соблюдение этих предосторожностей для избежания образования отложений в металлических трубах, что может создавать взрывоопасные условия. При попадании в глаза или на кожу, незамедлительно тщательно промойте водой.
4. Флуоросферы LeukoSure содержат 1% формальдегид. Избегайте попадания в глаза и на кожу, так как формальдегид может необратимо повредить эти ткани. Не вдыхайте пары. Пользуйтесь соответствующей защитой, такой как перчатки и защита для глаз.
5. Следует удалить весь алюминий от термосваренного покрытия с верха флакона с флуоросферами LeukoSure. Остатки алюминия могут прореагировать с формальдегидом и вызвать изменение в свечении флуоросфер.
6. Чтобы избежать получения ошибочных результатов после вскрытия флуоросферы LeukoSure следует хранить тщательно закрытыми в вертикальном положении для предовращения испарения или утечки.
7. Флуоросферы LeukoSure оседают в течение долгого времени. Перед использованием убедитесь, что флуоросферы полностью ресуспензированы. Избегайте чрезмерного перемешивания для минимизации возможности возникновения пузырьков воздуха. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, не пипетируйте пузыри воздуха.
8. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, используйте откалиброванную пипетку с позитивным вытеснением или пипетку повтора для подачи компонентов крови со сниженным числом лейкоцитов и LeukoSure флуоросфер.
9. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, для точного и аккуратного пипетирования образца со сниженным числом лейктоцитов и флуоросфер LeukoSure пользуйтесь техниками пипетирования, рекомендованными производителем пипетки.
10. Каждая партия флуоросфер LeukoSure имеет определённую концентрацию флуоросфер. При определении абсолютного количества клеток-мишеней убедитесь, что используете правильную аналитическую концентрацию.
11. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, убедитесь в том, что сосчитаны, по крайней мере, 10 000 флуоросфер LeukoSure.
12. С образцами, пробами и всеми материалами, с ними соприкасающимися, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
13. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
14. Помеченные и лизированные пробы следует анализировать на проточном цитометре в пределах 2 или менее часов после добавления флуоросфер LeukoSure.
15. Не используйте реагент после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.
16. Минимизируйте воздействие света на реагент при хранении или инкубации.
17. Избегайте бактериального заражения реагентов, так как оно может привести к ошибочным результатам.
18. Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этими реагентами.
19. Существуют отдельные свидетельства наличия канцерогенного эффекта.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

20. При попадании на кожу может вызывать сенсибилизацию.
21. Используйте соответствующую защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз и лица.
22. При попадании в глаза немедленно промойте их большим количеством воды и обратитесь к врачу.
23. Используйте только в хорошо вентилируемых зонах.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Используйте реагенты комплекта для подсчёта LeukoSure прямо из флаконов. Смешивайте флуоросферы LeukoSure на вихревом смесителе от 10 до 12 секунд. Подождите, пока рассеются пузыри воздуха, прежде чем пипетировать из флакона. Следует удалить весь алюминий от термосваренного покрытия с верха флакона с флуоросферами LeukoSure.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. При хранении при 2-8°C реагенты комплекта для подсчёта LeukoSure сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
2. Открытые флаконы с красящим и лизирующим реагентами LeukoSure сохраняют стабильность в течение 60 дней.
3. Открытые флаконы с флуоросферами LeukoSure сохраняют стабильность в течение 30 дней.

ПРИМЕЧАНИЕ: Открытые флаконы с флуоросферами LeukoSure следует хранить в вертикальном положении во избежание утечки.

ПРИМЕЧАНИЕ: При возникновении необходимости в дополнительных флуоросферах LeukoSure, заказывайте флуоросферы LeukoSure, Ч.№ 6607124.

4. Реагенты комплекта подсчёта LeukoSure перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-25°C).
5. Не замораживайте.
6. Минимизируйте воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любое внешнее изменение этих реагентов или значительные колебания значений, полученных на контрольных пробах, могут указывать на разрушение реагентов, и в таком случае их не следует использовать.

В норме красящий реагент LeukoSure выглядит как прозрачная жидкость розово-красного цвета.

В норме лизирующий реагент LeukoSure выглядит как прозрачная жидкость светло-коричневого цвета. Неспособность этого реагента к лизису красных клеток крови может указывать на его разрушение.

В норме флуоросферы LeukoSure выглядят как мутная бесцветная жидкость. Появление в процессе анализа вторичных флуоресцирующих популяций, составляющих более 20% всей популяции может указывать на разрушение реагента.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

Пробы красных клеток крови, собранные в CPD (цитрат фосфат декстроза), CPDA (цитрат фосфат декстроза аденина) или CPD2 (CPDA с Adsol), следует хранить охлаждёнными (2-8°C) до проведения тестов. Пробы тромбоцитов, собранные в ACD (кислой цитрат декстроза), следует хранить при комнатной температуре (20-25°C) до проведения тестов. Пробы следует окрашивать в течение 48 часов после снижения числа лейкоцитов.

Окрашенные пробы следует хранить при 2-8°C.

Пробы, окрашенные в пределах 24 часов после снижения числа лейкоцитов, можно анализировать в течение последующих 24 часов после мечения. Пробы, окрашенные после 24 часов и вплоть до 48 часов после снижения числа лейкоцитов, следует анализировать в течение 2 часов после мечения.

Перед проведением анализа доведите помеченые пробы до комнатной температуры.

После добавления флуоросфер LeukoSure, пробы сохраняют стабильность в течение 2 часов.

ПРОЦЕДУРА

ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Копмлект для подсчёта LeukoSure
REF 175621 - 200 тестов

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Пипетка повтора (100 µL) и наконечники

или

Пипетка с позитивным вытеснением (100 µL) и наконечники

Таймер

тест-пробирки 12 x 75 mm

Вихревой смеситель

Проточный цитометр

Флуоросферы Flow-Set, Ч.№ 6607007

Флуоросферы Flow-Check, Ч.№ 6605359

Изотонический раствор IsoFlow, Ч.№ 8547008

Очиститель COULTER CLENZ, Ч.№ 8546929

Комплект контроля тромбоцитов Leuko-Trol, Ч.№ 175651

или

Клетки контроля RBC Leuko-Trol, Ч.№ 175658

ПРИМЕЧАНИЕ: При возникновении необходимости в дополнительных флуоросферах LeukoSure, заказывайте флуоросферы LeukoSure, Ч.№ 6607124.

ПРОЦЕДУРА ЛИЗИСА И ОКРАШИВАНИЯ

1. Промаркируйте тест-пробирку 12 x 75 mm для тестирования каждого образца или клеток контроля Leuko-Trol.
2. Внесите в каждую пробирку по 100 µL пробы. Перед тем, как переносить пробу, аккуратно протрите внешнюю поверхность наконечника пипетки, избегая отверстия на кончике.
3. Добавьте 100 µL лизирующего реагента LeukoSure в первую пробирку; немедленно поставьте её перемешиваться в течение 5-10 секунд на вихревом смесителе.
4. Добавьте 500 µL красящего реагента LeukoSure в пробирку, немедленно смешайте на вихревом смесителе.
5. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25°C), в темноте, в течение 15 минут.
6. Повторите шаги со 2 по 5 для каждой пробирки с пробой.
7. Перед самым проведением анализа добавьте в каждую пробирку с пробой по 100 µL флуоросфер LeukoSure (пользуясь той же пипеткой, которой пипетировали образец). Перед тем, как переносить пробу, аккуратно протрите внешнюю поверхность наконечника пипетки, избегая отверстия на кончике. Аккуратно смешайте, пользуясь вихревым смесителем.
8. Пробы следует проанализировать в течение 2 часов после добавления флуоросфер LeukoSure.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для получения оптимальных результатов перемежайте прогоны проб прогоном холостой пробирки с изотоническим раствором IsoFlow.

АНАЛИЗ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИЕЙ

Подготовка прибора

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции. За инструкциями обратитесь к руководству по изделию или справочнику в сети.
2. Создайте протокол для флуоросфер Flow-Set с однопараметрической гистограммой для светорассеяния (одной для линейного рассеяния вперёд (FS) и другой – для бокового рассеяния (SS)) и тремя параметрами флуоресценции (LOG FL1, LOG FL2 и LOG FL3).
3. Создайте линейную зону в каждой гистограмме.
4. Назначьте зону гистограммы FS в качестве селектора для гистограмм SS и логарифма флуоресценции.
5. Установите компенсацию цвета на 0% для всех параметров флуоресценции.
6. На FL3 установите классификатор на 3.
7. Установите остановку на 10 000 событий для каждой гистограммы флуоресценции.
8. Запустите Flow-Set Fluorospheres для установки напряжений PMT. Целевые значения каналов см. в Таблице настроек целевого приложения Flow-Set Fluorospheres.

Протокол анализа проб

Создайте следующие гистограммы:

1. Создайте гистограмму 1, SS к FS (обращайтесь к Рисунку 1)
2. Создайте гистограмму 2, FL3 к Соотношению (FL3/FL2) (обращайтесь к Рисунку 2)
3. Создайте гистограмму 3, LOG FL1 к Количеству.

Объяснение гистограмм

Гистограмма 1 используется для визуального подтверждения обнаружения за счёт светорассеяния. Гистограмма 2 использует повышенную флуоресценцию лейкоцитов как в FL2, так и в FL3 для получения дополнительных данных для выявления ядросодержащих лейкоцитов среди тромбоцитов, красных клеток крови или обломков клеток. События, ложащиеся на диагональ этой гистограммы являются неспецифическим дебрисом и выводятся из анализа. Гистограмма 3 предоставляет зону флуоросфер LeukoSure, используемую при вычислении абсолютного количества WBC.

Создание зон

1. Создайте линейную **зону CAL (A)**, содержащую пик флуоросфер LeukoSure в **Гистограмме 3.**

Важно: Убедитесь в том, что зона CAL полностью охватывает синглеты популяции флуоросфер LeukoSure и что была использована правильная аналитическая концентрация x 10.

2. Создайте **аморфную зону (B)** на **Гистограмме 2**, чтобы объединить всю популяцию помеченных йодидом пропидия лейкоцитов.
3. В Гистограмме 1 аналитическая зона не нужна.
4. На **Гистограммах 1 и 2** для исключения флуоросфер используйте негативный селектор **[-A, или NOT (CAL)]**.
5. Используйте негативный селектор **[-B, or NOT (B)]** на **Гистограмме 3** для подсчёта только флуоросфер. Установите остановку счёта на 10 000 событий для этой гистограммы.

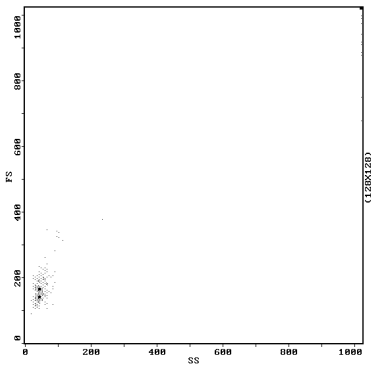
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Установки прибора

1. Перед прогоном проб или контроля, установите на FL3 классификатор на 50.
2. Переведите полученные после прогона протокола Flow-Set высокое напряжение и коэффициенты усиления на протокол анализа проб.
3. Установите время остановки на 300 секунд.
4. Пробы можно прогонять с уровнем потока, установленным на HIGH (высокий).
5. Сохраните протокол анализа проб.

Рисунок 1: Гистограмма 1 демонстрирует SS к FS и используется для визуального подтверждения обнаружения. Гистограммы показывают обнаружение Leuko-Trol, тромбоцитов H на EPICS XL/XL-MCL с программным обеспечением System II Version 3.0 (a) и на FC 500 с программным обеспечением RXP b).

a.



b.

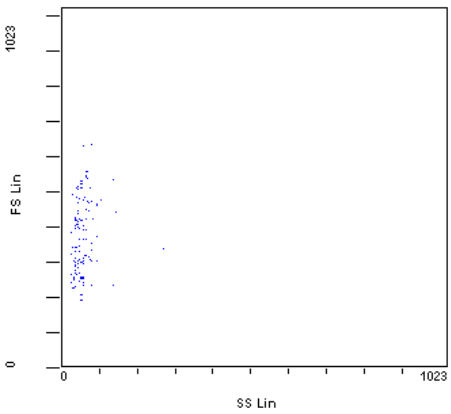
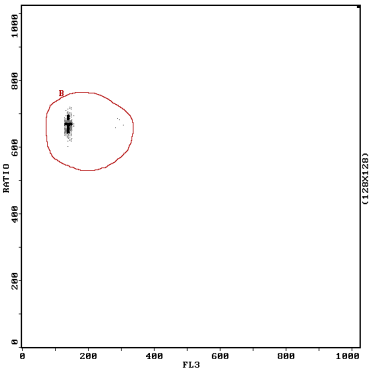
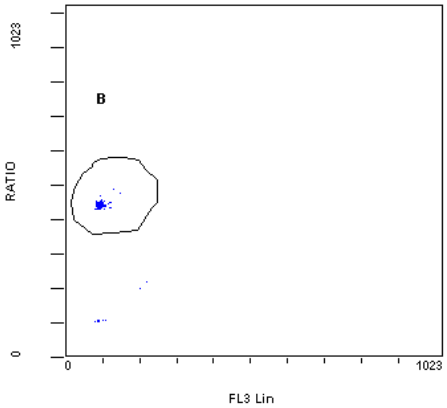


Рисунок 2: Гистограмма 2 демонстрирует is FL3 к соотношению (FL3/FL2), что даёт дополнительный материал для выявления ядросодержащих лейкоцитов среди тромбоцитов, красных клеток или клеточных обломков. События, ложащиеся на диагональ этой гистограммы являются неспецифическим дебрисом и выводятся из анализа. Гистограммы показывают обнаружение Leuko-Trol, тромбоцитов уровня H на EPICS XL/ XL-MCL с программным обеспечением System II Version 3.0 (a) и на FC 500 с программным обеспечением RXP (b).

a.



b.



Дополнительно доступные гистограммы

Эти гистограммы могут служить дополнительным источником информации при выявлении и оценке нарушений работы. Дополнительные гистограммы демонстрируют как однопараметрические события FL2 и FL3, так и соотношение время к флуоросферам LeukoSure.

1. Создайте гистограмму 4, FL2 к количеству с линейной зоной вокруг пика флуоресценции. Используйте негативный селектор **[-A, or NOT (CAL)].**
2. Создайте гистограмму 5, FL3 к количеству с линейной зоной вокруг пика флуоресценции. Используйте негативный селектор **[-A, or NOT (CAL)].**
3. Создайте гистограмму 6, время к LOG FL с прямолинейной зоной вокруг пика флуоресценции флуоросфер LeukoSure. Используйте негативный селектор **[-B, or NOT (B)].**

Контрольный протокол IsoFlow

Для создания протокола для прогона контрольной пробирки:

1. Сохраните протокол анализа проб как контрольный IsoFlow.
2. Снизьте время остановки до 60 секунд.
3. Сохраните контрольный протокол IsoFlow.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕРКИ ТЕХНИКИ ПИПЕТИРОВАНИЯ

Оптимальные результаты получаются при точном и аккуратном пипетировании и образца, и флуоросфер LeukoSure. Чтобы проверить, является техника пипетирования, использованная для подачи образца и флуоросфер LeukoSure, точной, следуйте описанной ниже процедуре проверки.

1. Поместите тест-пробирку и сосуд для уравновешивания на аналитические весы.
2. Настройте значение весов на нуль.
3. Следуя инструкции по пипетированию производителя пипетки, пипетируйте 100 µL образца или флуоросфер LeukoSure в тест-пробирку.
4. Перед тем, как переносить реагент, чтобы удалить его излишек, аккуратно протрите внешнюю поверхность наконечника пипетки, избегая отверстия на кончике.
5. Запишите вес тест-пробирки, сосуда для уравновешивания и перенесённого образца или LeukoSure.
6. Повторяйте шаги с 2 по 4, пока не взвесите по крайней мере 10 образцов или проб флуоросфер LeukoSure.
7. Вычислите среднее, стандартное отклонение (SD) и коэффицент вариации (% CV) взвешиваний.
8. % CV должен быть ≤ 2,0%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

Для определения абсолютного количества на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL или FC Series, введите аналитическую концентрацию флуоросфер LeukoSure в виде **десятикратного числа** (например, если аналитическая концентрация равна 1004, вы введёте 10040) при именовании зоны в соответствии с 12 шагом инструкции под заголовком АНАЛИЗ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИЕЙ. После того, как сосчитаны по крайней мере 10000 флуоросфер, абсолютное количество клеток-мишеней вычисляется по следующей формуле:

> Абсолютное количество (клеток/10 µL) = (Общее число сосчитанных клеток, делённое на общее число сосчитанных флуоросфер) умноженное на десятикратную аналитическую концентрацию флуоросфер LeukoSure.

Полученный результат исчисляется в WBC/10 µL. Для перевода значения в WBC/µL, разделите его на 10.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Линейность

Были проведены повторные измерения для каждого из 10 последовательных разведений эритроцитов и тробоцитарных проб с добавкой лейкоцитов для получения динамического диапазона (от 0 до 400 клеток/µL) и диапазона чувствительности нижнего края (от 0 до 20 клеток/µL). Пробы были подготовлены в соответствии с инструкцией на вкладыше в комплект для подсчёта LeukoSure и проанализированы на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL и Cytomics FC 500. Полученные значения приведены в виде абсолютного количества (клетки/µL).

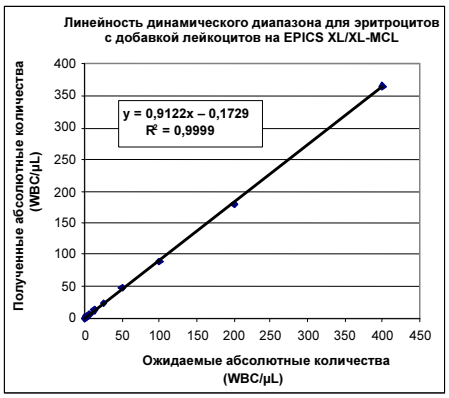
Угловой коэффицент линий регрессии, связанных с графиком абсолютного количества лейкоцитов показывает математическую меру линейности. Это подтверждается минимальным потенциальным аналитическим отклонением, подтверждённым у-пересечениями для анализов. Ожидаемые абсолютные количества показывают высокую корреляцию с полученными. См. Рисунки с 3 по 6, показывающие динамический диапазон (3, 5) и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

чувствительность нижнего края (4, 6) проб тромбоцитов и эритроцитов с добавкой лейкоцитов на проточных цитометрах XL/XL-MCL (a) и FC 500 (b).

Рисунок 3: Линейность, динамический диапазон и эритроциты на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL (a) и Cytomics FC 500 (b).

a.



b.



Рисунок 4: Линейность, чувствительность нижнего края и эритроцитов на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL (a) и Cytomics FC 500 (b).

a.



b.

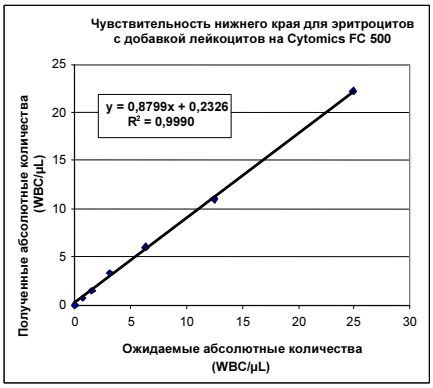


Рисунок 5: Линейность, динамический диапазон и тромбоциты на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL (a) и Cytomics FC 500 (b).

a.



b.

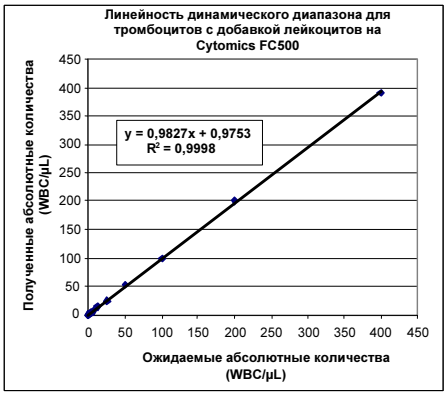
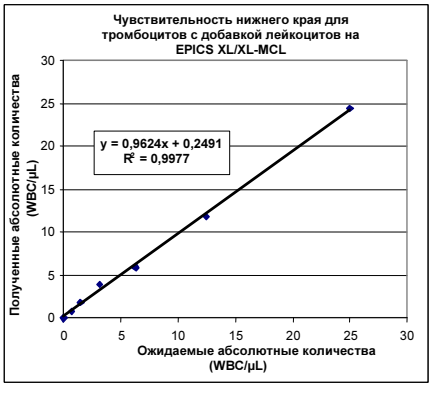
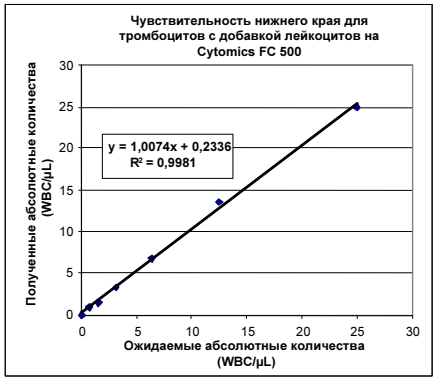


Рисунок 6: Линейность, чувствительность нижнего края и тромбоциты на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL (a) и Cytomics FC 500 (b).

a.



b.



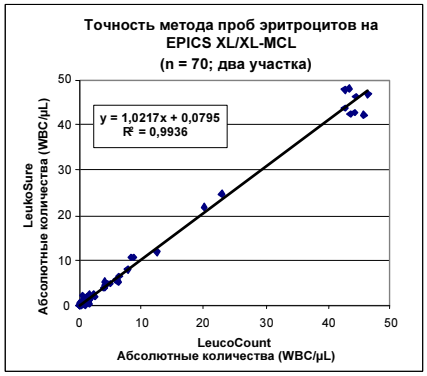
НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА

Степень надёжности получения абсолютного количества белых клеток крови в пробах эритроцитов и тромбоцитов со сниженным числом лейкоцитов была оценена посредством сравнения комплекта для подсчёта LeukoSure с комплектом LeucoCount (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) в Beckman Coulter, Inc. и двух независимых местах оценки.

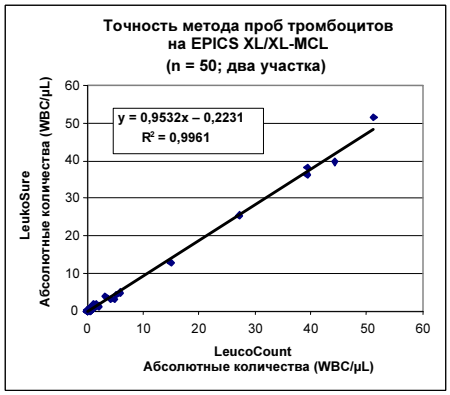
Продукты крови со сниженным числом лейкоцитов с эритроцитами и с тромбоцитами были подготовлены в соответствии с инструкциями изготовителей и проанализированы на EPICS XL/XL-MCL и Cytomics FC 500 с использованием комплекта для подсчёта LeukoSure и на проточном цитометре BD FACS Brand с использованием комплекта LeucoCount. Графики этих данных содержатся в рисунках 7 и 8.

Рисунок 7: Надёжность комплекта для подсчёта LeukoSure (EPICS XL/XL-MCL) к комплекту LeucoCount (BD FACS) для проб эритроцитов (a) и тромбоцитов (b).

a.



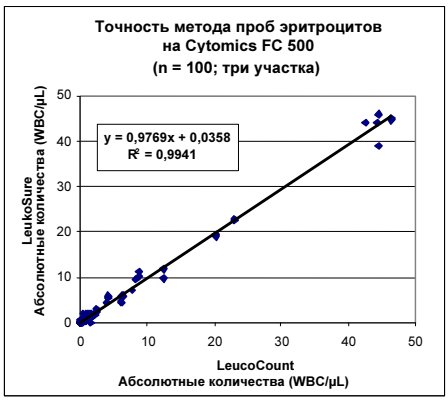
b.



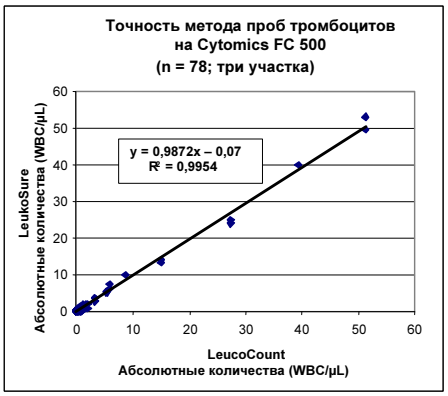
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 8: Надёжность комплекта для подсчёта LeukoSure (Cytomics FC 500) к комплекту LeucoCount (BD FACS) для проб эритроцитов (a) и тромбоцитов (b).

a.



b.



СХОДИМОСТЬ

Межлабораторная и внутрилабораторная сходимость

Исследования были проведены в один день на трёх разных проточных цитометрах – EPICS XL/XL-MCL, a Cytomics FC 500 и BD FACSCalibur. Для проб эритроцитов и тромбоцитов были подготовлены по четыре образца, перекрывающих динамический диапазон (от 0 до 400 WBC/µL). Эти образцы разбивались на три аликвоты, по аликвоте каждой концентрации на каждый проточный цитометр для приготовления проб (n = 10). Полученные значения приведены в виде абсолютного количества (WBC/µL).

Результаты изучения межлабораторной и внутрилабораторной сходимости, данные по типу пробы, концентрации и прибору, приведены в таблице 1. Полученные значения показали низкую вариабельность при сравнении приборов и в рамках типа и концентрации пробы, как можно видеть по средним значениям, а также низкий уровень отклонений значений для повторных измерений. Эти данные показывают сходимость и воспроизводимость результатов комплекта для подсчёта LeukoSure.

Таблица 1: Межлабораторная и внутрилабораторная сходимость

	Внутрилабораторная сходимость			Межлабораторная сходимость
Проба Концентрация	EPICS XL/XL-MCL	Cytomics FC 500	BD FACSCalibur	Совмещённые
Эритроциты / Низкая				
n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/µL)	1,1	0,9	1,2	1,1
SD:	0,34	0,30	0,56	0,42
Эритроциты / Низкая-Средняя				
n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/µL)	4,7	4,7	4,4	4,6
SD:	1,01	0,78	0,67	0,81
Эритроциты / Средняя				
n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/µL)	48,2	42,9	41,0	44,0
SD:	3,16	1,35	1,91	3,79
Эритроциты / Высокая				
n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/µL)	437,2	432,8	425,1	431,7
SD:	11,85	9,4	6,7	10,54
Тромбоциты / Низкая				
n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/µL)	0,4	0,4	0,3	0,4
SD:	0,20	0,27	0,18	0,22
Тромбоциты / Низкая-Средняя				
n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/µL)	3,6	4,2	4,3	4,0
SD:	0,51	0,78	0,78	0,74
Тромбоциты / Средняя				
n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/µL)	38,2	37,8	39,6	38,5
SD:	1,73	1,71	2,3	1,0
Тромбоциты / Высокая				
n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/µL)	383,6	386,7	377,1	382,5
SD:	5,30	7,74	6,46	7,53

Стабильность

- Стабильность проб проверялась путём сравнения проб, помеченных и обработанных в пределах 6 часов после снижения числа лейкоцитов, с пробами, помеченными и обработанными по прошествии от 24 до 48 часов после снижения числа лейкоцитов, и анализированных в пределах 2 часов.
- Стабильность окрашенных проб определялась путём сравнения проб, окрашенных и обработанных в пределах 6 часов после снижения числа лейкоцитов, с пробами, окрашенными через 24 часа и проанализированными после дополнительных 24 часов хранения.
- Перед окрашиванием продукты с следует охлаждать (2-8°C), а концентраты тромбоцитов держать при комнатной температуре (20-25°C).

Как можно увидеть по таблице 2, пробы с эритроцитами и с тромбоцитами можно помечать в пределах 48 часов после снижения числа лейкоцитов.

Пробы, помеченные в пределах 24 часов после снижения числа лейкоцитов, можно анализировать в течение последующих 24 часов после мечения. Стабильность окрашенных проб, хранящихся 24 часа, показана в таблице 3.

Таблица 2: Стабильность проб, помеченных в пределах 48 часов после снижения числа лейкоцитов

Тип пробы	n	Время 0 (WBC/µL)	Среднее различие через 24 часа (WBC/µL)	Среднее различие через 48 часов (WBC/µL)
Эритро-циты	3	0,9	+0,1	–0,1
	3	4,7	+0,3	+0,2
	3	46,7	–2,8	–2,0
	3	436	+13,9	–27,2
Тромбо-циты	3	0,3	0	+0,1
	3	3,3	+1,1	+0,7
	3	38,1	+1,8	–1,8
	3	372,5	+22,7	–11,7

Таблица 3: Стабильность проб, помеченных в течение 24 часов, и обработанных после 24 часов хранения

Тип пробы	n	Время 0 (WBC/µL)	Среднее различие через 24 часа (WBC/µL)
Эритроциты	6	0,9	+0,3
	6	4,7	+0,3
	6	46,7	+2,6
	6	436	+21,9
Тромбоциты	6	0,3	+0,1
	6	3,3	+0,4
	6	28,1	+0,2
	6	372,5	+0,3

СРАВНЕНИЕ ПРОТОЧНЫХ ЦИТОМЕТРОВ

Работа комплекта для подсчёта LeukoSure была проверена на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL, FC 500 и BD FACS Brand. Результаты анализа регрессии 30 проб эритроцитов и тромбоцитов показаны в таблице 4.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4: Сравнение работы комплекта для подсчёта LeukoSure на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL или Cytomics FC 500 vs. BD FACS Brand

Прибор и тип пробы	n	Угловой коэффициент	Пересечение	Корреляция
EPICS XL/XL-MCL				
Эритроциты	30	0,9856	–0,2008	0,9924
Тромбоциты	30	1,0281	0,2681	0,9906
Cytomics FC 500				
Эритроциты	30	1,0485	–0,0963	0,9900
Тромбоциты	30	0,9967	0,0187	0,9833

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность реагентов

Йодид пропидия образует комплексы с двухцепочечной РНК и ДНК. В присутствии РНКазы, используемой для удаления двухцепочечной РНК, йодид пропидия стехиометрически связывается с двухцепочечной ДНК таким образом, что ядросодержащие клетки в пробе флуоресцируют с интенсивностью, пропорциональной содержанию в них ДНК.[7, 8]

Контроль качества

Для достижения оптимальных результатов, убедитесь в том, что пипетки откалиброваны в соответствии с частотой, рекомендованной производителем. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции. За инструкцией обратитесь к руководству по изделию соответствующего прибора.

Проверяйте пробы эритроцитов на лизис эритроцитов, рассматривая пробирки с пробами после обработки и оценивая гистограммы светорассеяния. Нелизировавшиеся пробы выглядят в пробирке мутными. Частично лизировавшиеся пробы будут содержать тяжелые или аномальные лейкоцитарные популяции светорассеяния.

Ежедневно обрабатывайте и анализируйте соответствующие клетки контроля Leuko-Trol, используя протокол анализа проб. Получаемые значения абсолютных количеств должны попадать в диапазон ожидаемых значений, указанный на соответствующем листе данных анализа.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для получения оптимальных результатов перемежайте прогоны проб прогоном контрольной пробирки с изотоническим раствором IsoFlow.
2. Реагенты следует использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке комплекта.
3. Если проба эритроцитов кажется мутной, лизис не прошёл до конца.
4. NRBC (ядросодержащие эритроциты) могут не до конца лизироваться и оказаться включёнными в лейкоцитарные популяции светорассеяния.
5. Пробы следует проанализировать в течение 2 часов после добавления флуоросфер LeukoSure.
6. За информацией о прочих ограничениях в использовании реагента обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.
7. За информацией об ограничениях клеток контроля Leuko-Trol, обратитесь к вкладышу в упаковке соответсвующего продукта.

ССЫЛКИ

1. Lane TA, Anderson KC, Goodnough LT, Kutz S, Moroff G, Pisciotto PT, Sayers M and Silberstein LE. 1992. Leukocyte reduction in blood component therapy. Ann Itern Med 117:151-162.
2. Zoon KC. 1996. Recommendations and licensure requirements for WBC-reduced blood products. Bethesda, M: FDA. **www.fda.gov/cber/bldmem/mem52996.txt.**
3. Draft Guidance for Industry: Pre-Storage Leukocyte Reduction of Whole Blood and Blood Components Intended for Transfusion. **www.fda.gov/cber/gdlns/preleuk.pdf.**
4. Sirchia G and Rebulla P. 1995. Enumeration of low white cells in Clinical Benefits of Leukodepleted Blood Products, Sweeney J and Heaton A, eds. RG Landes Company. Chapter 3:17-27.
5. Dzik S, Moroff G and Dumont L. 2000. A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte hemocytometry, flow cytometry, and microfluorometry. Transfusion 40:513-520.
6. Van De Meer PF, Gratama JW, Van Delden CJ, Laport RF, Levering WHBM, Schrijver JG, Tiekstra MJ, Keeney M and de Wildt-Eggen J. 2001. Comparison of five platforms for enumeration of residual leucocytes in leukoreduced blood components. Brit J Haem 115:953-962.
7. Crissman HA and Steinkamp JA. 1973. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. J Cell Biology 59:766-771.
8. Shapiro HM: 1995. Practical Flow Cytometry. Extrinsic Parameters. Third Edition, New York: Wiley-Liss, p. 251-262.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Копмлект для подсчёта LeukoSure

REF 175621 - 200 тестов

Флуоросферы LeukoSure

REF 6607124 - 200 тестов

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2020 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Версия EC, 08/2016

Изменения были внесены в:

- Обновленный адрес представительства в ЕС

Версия ED, 10/2018

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки

Версия EE, 03/2020

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Комплект QuickComp 4
CD45-FITC - 50 тестов
CD45-PE - 50 тестов
CD45-ECD- 50 тестов
CD45-PC5 - 50 тестов
REF **177017**

Комплект QuickComp 2
CD45-FITC - 50 тестов
CD45-PE - 50 тестов
REF **177018**

Инструкции по применению
Ч.№ 177316-FK

CE BECKMAN COULTER

	CD45-FITC	CD45-PE	CD45-ECD	CD45-PC5
Специфичность	Все лейкоциты	Все лейкоциты	Все лейкоциты	Все лейкоциты
Клон	J33	J33	J33	J33
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Линия человеческих клеток Lazz 221	Линия человеческих клеток Lazz 221	Линия человеческих клеток Lazz 221	Линия человеческих клеток Lazz 221
подкласс Ig	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Асцитная жидкость	Асцитная жидкость	Асцитная жидкость	Асцитная жидкость
Очистка	Ионообменная или аффинная хроматография	Ионообменная или аффинная хроматография	Ионообменная или аффинная хроматография	Ионообменная или аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 468-509 nm Излучение при 504-541 nm	Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 568-590 nm	Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 610-635 nm	Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 660-680 nm
Коньюгат	FITC (изотиоцианат флуоресцеина)	PE (Фикоэритрин)	ECD (Фикоэритрин-Texas Red®X)	PC5 (Фикоэритрин-Cy5)
Молярная концентрация	3 - 10	0,5 – 1,5	0,5 – 1,5	0,5 – 1,5

РЕАГЕНТЫ ДЛЯ РЕГУЛИРОВКИ НАСТРОЕК ЦВЕТОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ В ПРОТОЧНЫХ ЦИТОМЕТРАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЕНСАЦИИ ПО ВСЕЙ МАТРИЦЕ ДЛЯ МНОГОЦВЕТНОГО АНАЛИЗА

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект QuickComp 4 состоит из четырех одноцветных флуоресцентных реагентов, каждый из которых получен из одного моноклонального антитела. Каждое антитело помечено одним из четырех флуорохромов: FITC, PE, ECD или PC5.

Комплект QuickComp 2 состоит из двух одноцветных флуоресцентных реагентов, каждый из которых получен из одного моноклонального антитела. Каждое антитело помечено FITC или PE.

Комплекты QuickComp 4 и QuickComp 2 можно использовать с набором клеток CYTO-COMP для регулировки настроек цветовой компенсации проточного цитометра, оборудованного программным обеспечением автоматической настройки, перед выполнением многоцветного анализа с использованием реагентов, содержащих моноклональные антитела, конъюгированные с FITC, PE, ECD и/или PC5.

Инструкции по приготовлению клеток см. на вкладыше в упаковке комплекта клеток CYTO-COMP (Ч.№ 6607023).

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

Комплект QuickComp 4,
REF 177017

Ч.№ 177114	CD45-FITC - 50 тестов
Ч.№ 177115	CD45-PE - 50 тестов
Ч.№ 177116	CD45-ECD - 50 тестов
Ч.№ 177117	CD45-PC5 - 50 тестов

Комплект QuickComp 2,
REF 177018

Ч.№ 177114	CD45-FITC - 50 тестов
Ч.№ 177115	CD45-PE - 50 тестов

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Кроме антител, в состав реагентов входят 0,2% BSA, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3 и стабилизаторы.

Показания: не применимо.

Противопоказания: не применимо.

Побочные эффекты: не применимо.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

1. Эти реагенты содержат 0,1% азида натрия. Азид натрия в кислой среде образует азотисто-водородную кислоту, которая является крайне токсичным соединением. Азидные соединения необходимо промывать проточной водой до тех пор, пока они не будут удалены. Данные меры предосторожности рекомендуется выполнять во избежание отложения на металлических трубах азидных соединений, являющихся взрывоопасными. При попадании на кожу или в глаза обильно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
3. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
4. При попадании в организм существует опасность отравления.
5. При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды.
6. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке комплекта.
7. При хранении и инкубации сведите к минимуму воздействие света на реагенты.
8. При работе с этими реагентами следуйте принципам надлежащей лабораторной практики (GLP).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытые реагенты стабильны до истечения срока годности при хранении при температуре 2-8°C. Открытые флаконы стабильны в течение 90 дней при хранении при температуре 2-8°C. Поместите реагенты в место с температурой 2-8°C сразу после использования. Не замораживайте. Сведите к минимуму воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических характеристик реагентов* могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагенты использовать нельзя. Перед использованием доведите реагенты до температуры в 20-25°C.

***Нормальные характеристики реагентов**

С этикеткой FITC	Прозрачная жидкость, от бесцветной до желтой.
С этикеткой PE	Прозрачная жидкость, от бесцветной до розовой.
С этикеткой ECD	Прозрачная жидкость, от бесцветной до розовой.
С этикеткой PC5	Прозрачная жидкость, от бесцветной до розовой.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

ПРОЦЕДУРА

Подготовка пробы

1. Инструкции по подготовке клеток см. на вкладыше в упаковке комплекта клеток CYTO-COMP (Ч.№ 6607023).
2. Выберите соответствующие комбинации флуорохромов для выбранной многоцветной схемы.
3. Пипетируйте 20 µL реагентов QuickComp в отдельные помеченные тестовые пробирки.
4. Добавьте 100 µL приготовленных клеток CYTO-COMP в каждую тестовую пробирку.
5. Аккуратно перемешайте на вихревом смесителе и инкубируйте при температуре 20-25°C в течение 15 минут.
6. Добавьте 1 mL физиологического раствора с фосфатным буфером к каждой тестовой пробирке для клеток CYTO-COMP.
7. Аккуратно перемешайте на вихревом смесителе.
8. Подготовленные пробы можно хранить при комнатной температуре в темном месте, если проточная цитометрия будет выполнена в течение 2 часов после подготовки. В противном случае закройте пробы и храните в темноте при температуре 2-8°C не дольше 24 часов.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.
2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо третьих лиц, либо непреодолимой силы.
3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер» 109004, г. Москва, ул. Станиславского, д.21, стр.3
Тел./факс, e-mail: (495) 9846730/(495) 228-67-00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

Настройка цветовой компенсации

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован.
2. Проанализируйте пробы с теми же стандартизованными настройками высокого напряжения и усиления, которые использовались с приложением многоцветного анализа.
3. Стандартизация напряжения прибора, цветовая компенсация и определение антител выполняется автоматически. Инструкции о выполнении процедур автоматической настройки см. в соответствующих руководствах к прибору/интерактивной справке.
4. Переместите установленные настройки цветовой компенсации в протокол, используемый при многоцветном анализе.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Комплект QuickComp 4,
REF 177017
Комплект QuickComp 2,
REF 177018

Для получения дополнительной информации или в случае повреждения продукта обращайтесь в службу поддержки клиентов компании Beckman Coulter 800-742-2345 (США или Канада) или обратитесь к региональному представителю компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

СВЕДЕНИЯ О ПЕРЕРАБОТКЕ И ИСПРАВЛЕНИИ ИЗДАНИЯ

Редакция FH, 09/2017

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки

Редакция FJ, 07/2018

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Редакция FK, 10/2018

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

IMMUNO-BRITE
Комплект стандартов

REF 6603473

Ч.№ 4235777-NE

CE BECKMAN COULTER

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ
Используется как реагент контроля качества проточной цитометрии для определения линейности прибора и стандартизации интенсивности флуоресценции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ
Комплект стандартов EPICS IMMUNO-BRITE (Ч.№ 6603473) содержит пять флаконов. Каждый флакон содержит частицы с определённой интенсивностью флуоресценции. Blank, Med-Low, Reference-Med, Med-Hi, and Brite. В каждом флаконе содержится 10 mL суспензии частиц в концентрации 1 x 10^6/mL в водном диспергаторе с консервантом. Эти частицы состоят из полистирола и флуоресцентного красителя. Флуоресцентный краситель светоизлучает на длине от 525 до 700 nm при возбуждении волной длины 488 nm. Комплект используется для проверки линейности логарифмического усилителя.

РЕАКТИВЫ
Частицы, 10 mL в концентрации 1x 10^6/mL
- Уровень I (Blank)
- Уровень II (Med-Low)
- Уровень III (Reference-Med)
- Уровень IV (Med-Hi)
- Уровень V (Brite)

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

ВНИМАНИЕ
реакционная масса из 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-она [EC № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин-3-она [EC № 220-239-6](3:1) <0,05%
Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения/лица.
При появлении раздражения кожи или сыпи: обратиться за медицинской помощью.
Снять загрязненную одежду и постирать перед использованием.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

ИНСТРУКЦИИ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ
Проверка линейности прибора необходима для гарантии того, что сигналы с низкой и высокой интенсивностью усиливались в одном соотношении.
1. Оптически совместите проточный цитометр с Flow-Check (Ч.№ 6605359) Fluorospheres для совмещения.
2. Отмерьте в пробирку 0,5 mL IMMUNO-BRITE Standard из флакона Уровня III.
3. Составьте гистограммы соотношения рассеяния вперед с боковым рассеянием при скорости подсчёта от 100 до 500 частиц/с. Составьте гистограммы зависимости логарифма флуоресценции с каждого ФЭУ флуоресценции. Настройте селекцию на основное распределение гистограммы рассеяния для исключения дуплетов и фона из анализа. Отрегулируйте значения напряжения ФЭУ до уровня, необходимого для тестирования. Положения пиков, представляющих флуоресцирующие и пустые зоны, будут варьировать в зависимости от использованного напряжения. Для вычисления линейности на шкале должны быть видны как минимум три пика.
4. Введите изменения напряжения ФЭУ в протокол прибора.
5. Отмерьте по 0,5 mL из каждого из пяти флаконов IMMUNO-BRITE (Уровни с I по V) в пробирку и запустите протокол, следуя указаниям пункта 3.
6. Проанализируйте каждую гистограмму флуоресценции. Установите курсоры у каждого пика флуоресценции и запишите средние значения по каналам.
7. Нанесите соотношение между полученными средними значениями по каналам и относительным разделением на предоставленную миллиметровую бумагу.
8. Соедините четыре точки, представляющие частицы уровней со II по V. Результирующий график должен быть приблизительно прямым. если он таковым не является, повторите процедуру. Если всё так же не получается прямая линия, прибор требует рекалибровки представителем сервисного центра компании Beckman Coulter.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТА
Неиспользуемый реагент хранить при температуре 2-8°C. При хранении при температуре 2-8°C содержимое невскрытых флаконов должно оставаться стабильным до истечения срока годности, указанного на упаковке.

При невозможности достижения ожидаемых результатов рекомендуется обратиться к руководству по исправлению неисправностей аппарата. Суспензии частиц не должны пересыхать. Выбрасывайте ранее приготовленные пробы. Каждый раз при проведении анализа готовьте новую пробу. Пробы, содержащие дуплеты, следует недолго обрабатывать в ультразвуковой ванне до удаления дуплетов.

ИСТОЧНИКИ

1. Perfetto S, Ross W, Riley R, Mahin E. Quality Assurance and Quality Control in Flow Cytometry. Clinical Applications of Flow Cytometry. 1993. p. 867-868.
2. Riley R, Ross W, Perfetto S. Setting up a Flow Cytometry Laboratory. Flow Cytometry and Clinical Diagnosis. 1994. p. 163-164.

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с локальным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

ВО ИЗБЕЖАНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ И ДЕГРАДАЦИИ НЕ АСПИРИРУЙТЕ РЕАГЕНТ НАПРЯМУЮ ИЗ БУТЫЛКИ.

Версия Статус

Версия ND, 08/2016

Изменения были внесены в:
- Обновленный адрес представительства в ЕС

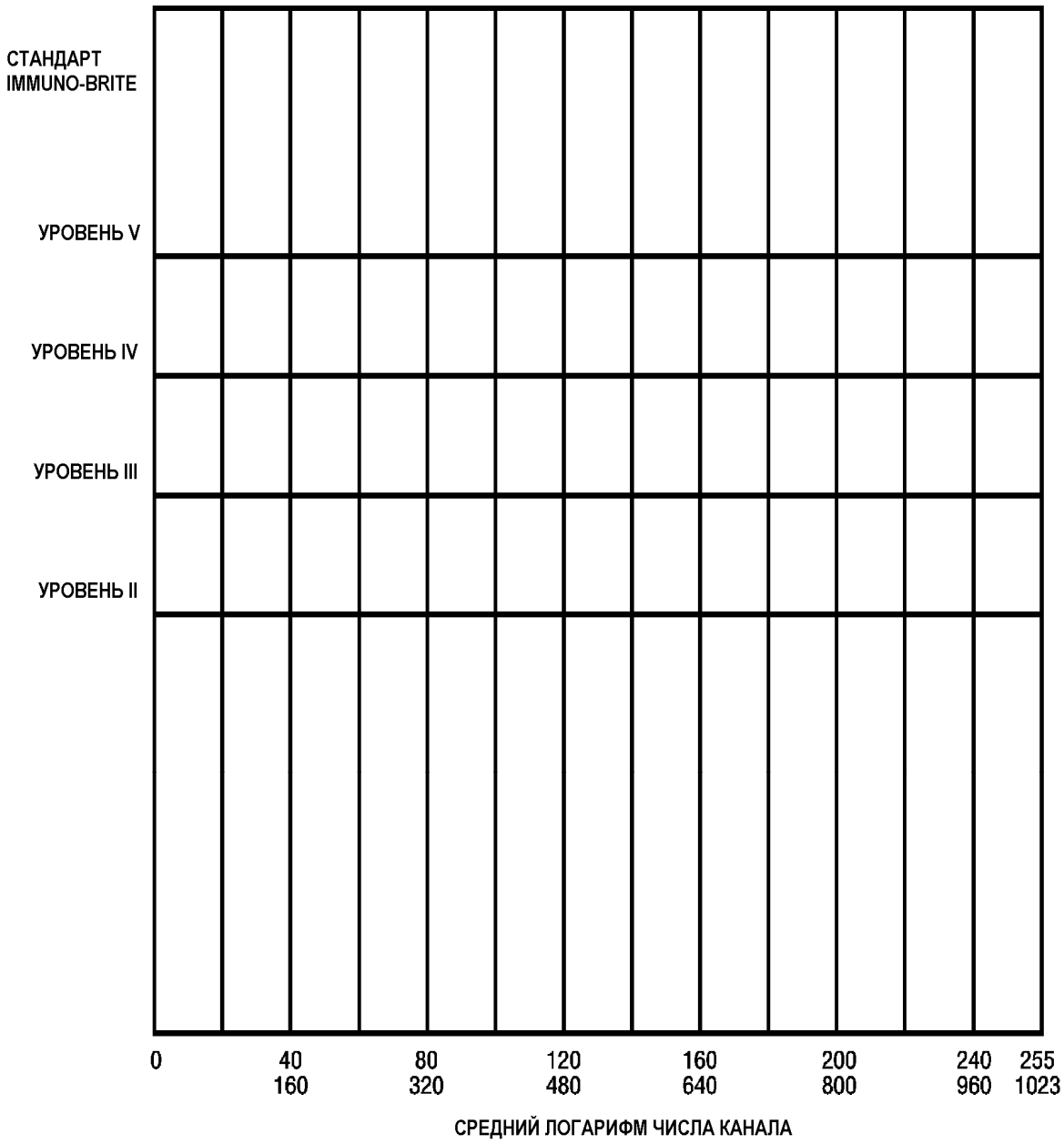
Версия NE, 10/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КОМПЛЕКТ СТАНДАРТОВ IMMUNO-BRITE
Проверка линейности логарифмического усилителя

Используйте эту страницу для записи логарифмов каналов, принимающих значения от 1 до 255 ИЛИ от 1 до 1023



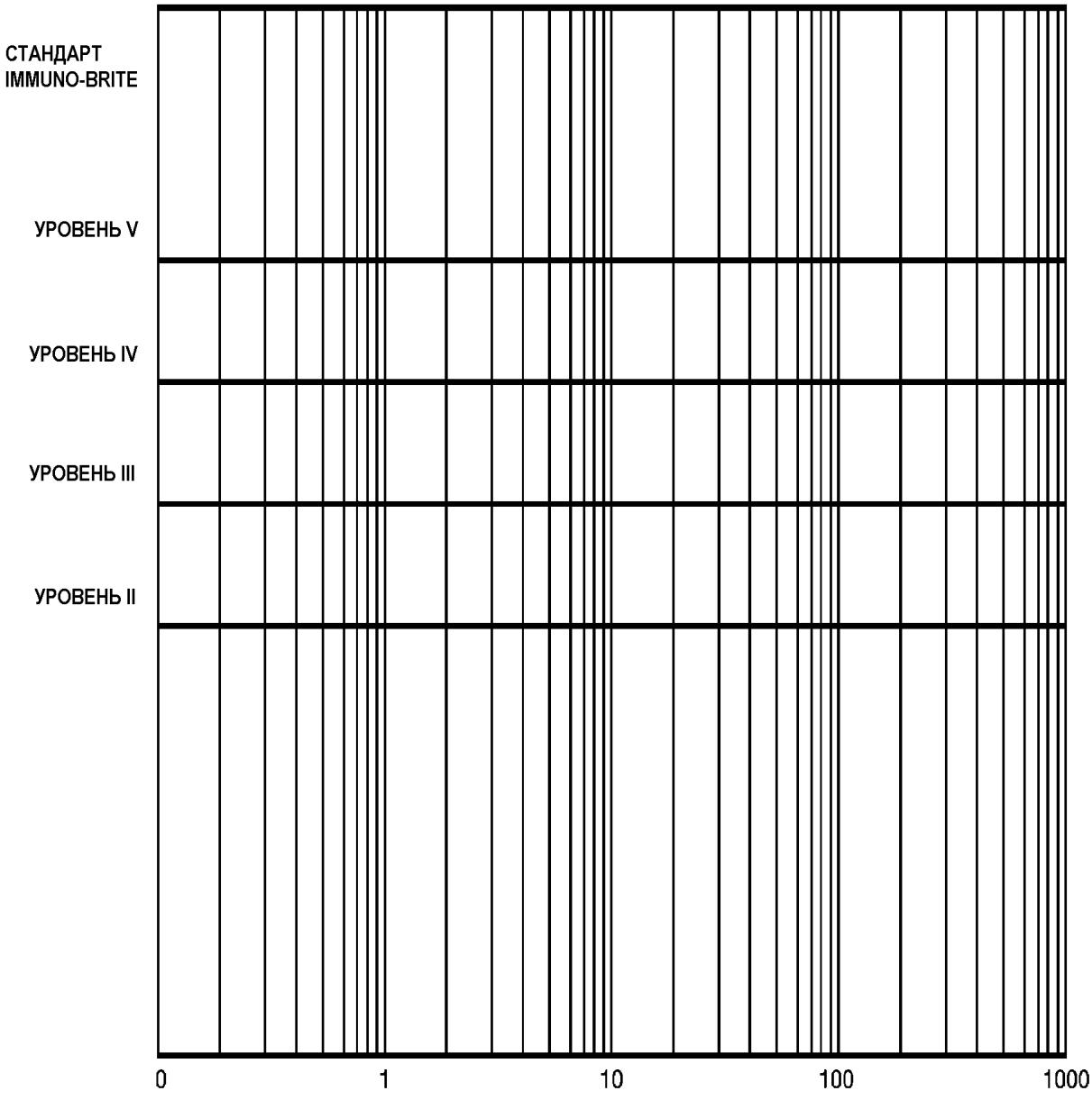
Месяц: _____ Год: _____ Номер партии _____

Срок годности _____/_____/_____

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КОМПЛЕКТ СТАНДАРТОВ IMMUNO-BRITE
Проверка линейности логарифмического усилителя

Используйте эту страницу для записи логарифмов каналов, принимающих значения от 0,1 или 1 до 1000



Месяц: _____ **Год:** _____ **Номер партии** _____

Срок годности _____/_____/_____

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT/ COULTER CLONE MsIgG1-RD1/ MsIgG1-FITC

REF 6603796 - 50 тестов

Ч.№ 4238082-GD

CE BECKMAN COULTER

	MsIgG1-RD1	MsIgG1-FITC
Специфичность	Не применимо	Не применимо
Клон	2T8-2F5	2T8-2F5
Гибридома	NS1 x BALB/c	NS1 x BALB/c
Иммуноген	Не применимо	Не применимо
Цепь Ig	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь
Источник	Кондиционированная среда	Кондиционированная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 486-580 nm / Излучение при 568-590 nm	Возбуждение при 468-509 nm / Излучение при 504-541 nm
Конъюгация	RD1 (Фикоэритрин)	FITC (Флуоресцин изотиоцианат)
Молярное отношение	RD1/Белок: 0,5-1,5	FITC/Белок: 3-10
Определение светорассеивания	Переднее и (или) боковое	Переднее и (или) боковое

ИЗОТИПИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Изотипический контрольный реагент CYTO-STAT/ COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC состоит из двух мышиных моноклональных антител, помеченных разными флуорохромами. Данный продукт предназначен для использования в качестве реагента контроля качества, он позволяет оценить уровень связывания неспецифических антител во время окрашивания клеточной поверхности при использовании реагентов моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE. Эти реагенты состоят из мышиных моноклональных антител подкласса IgG1, связанных с FITC или RD1.

CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG1-RD1/ MsIgG1-FITC предназначены для диагностики in vitro, если используются совместно с реагентами моноклональных антител CYTO-STAT/ COULTER CLONE с маркировкой “Для диагностики in vitro". В остальных случаях эти реагенты предназначены только для исследовательских целей. Не для использования в диагностике.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ

Антитела MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC используются для контроля уровня неспецифического окрашивания при окрашивании клеток с использованием мышиных антител подкласса IgG1, связанных с RD1 и FITC.[1-3]

РЕАГЕНТ

Смотрите таблицу выше.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Концентрация антител — 1,1/1,1 µg/тест.

Не содержащие антител реагенты содержат 0,2% BSA, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3, а также стабилизаторы.

СВЕДЕНИЯ О ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯХ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com***.

1. Данный реагент содержит 0,1% азида натрия. Азид натрия в кислой среде образует азотисто-водородную кислоту, которая является крайне токсичным соединением. При утилизации азидные соединения необходимо смывать проточной водой. Данные меры предосторожности рекомендуется выполнять во избежание отложения в металлических трубах азидных соединений, являющихся взрывоопасными. При попадании на кожу или в глаза обильно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
3. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
4. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. При хранении или инкубации минимизируйте воздействие света на реагенты.
6. Избегайте микробной контаминации реагента, в противном случае возможно получение ошибочных результатов.
7. При работе с этим реагентом следуйте принципам надлежащей лабораторной практики (GLP).
8. При попадании в организм существует опасность отравления.
9. При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Не замораживайте. Сведите к минимуму воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств реагента (в норме это прозрачная бесцветная или розовая жидкость) или значительные отклонения значений контрольных проб могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагент использовать нельзя.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление не требуется. Реагенты CYTO-STAT/ COULTER CLONE используются непосредственно из пробирки. Перед использованием доведите температуру реагентов до 20-25°C.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Данный реагент предназначен для использования в стандартной методике проточной цитометрии с системой реагентов и рабочей станцией COULTER Q-PREP/IMMUNOPREP, MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP или TQ-Prep/IMMUNOPREP. Инструкции по использованию этого контрольного реагента см. на вкладыше к реагенту моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE.

ИЗБРАННЫЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ

1. ASHI Standards For Clinical Flow Cytometry and Cell Surface Phenotyping Laboratories. 1987. ASHI Quarterly 11(1).
2. Clinical and Laboratory Standards Institute: Enumeration of Immunologically Defined Cell populations by Flow Cytometry; Approved Guideline (H42); Approved Edition.
3. Flow Cytometry Inspection Checklist. Fall 1988. College of American Pathologists, Commission on Laboratory Accreditation, p. 9.

ДОСТУПНОСТЬ ПРОДУКТА

CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC,
REF 6603796 - 50 тестов (0,5 mL)

Для получения дополнительной информации или в случае повреждения продукта обращайтесь в службу поддержки клиентов компании Beckman Coulter 800-742-2345 (США или Канада) или обратитесь к региональному представителю компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

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

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

Версия Статус

Версия GD, 09/2016

Изменения были внесены в:

- Обновленный адрес представительства в ЕС

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT/ COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC

REF 6603801 - 50 тестов

Ч.№ 4235853-MD

CE BECKMAN COULTER

	T11-RD1	B4-FITC
Специфичность	CD2	CD19
Клон	SFCI3Pt2H9	89B
Гибридома	NS/1-AG4 x BALB/c	NS/1-AG4 x BALB/c
Иммуноген	Опухолевые клетки от пациентов с Т-клеточным хроническим лимфолейкозом	Опухолевые клетки от пациентов с В-клеточным хроническим лимфолейкозом
Цепь Ig	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость мыши	Кондиционированная среда
Очистка	Ионообменная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 486-575 nm / Излучение при 568-590 nm	Возбуждение при 468-509 nm / Излучение при 504-541 nm
Конъюгация	RD1 (Фикоэритрин)	FITC (Флуоресцин изотиоцианат)
Молярное отношение	RD1/Белок: 0,5-1,5	FITC/Белок: 5-10

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC представляет собой реагент с двойной флуоресценцией, состоящий из двух мышиных моноклональных антител. Каждое из антител помечено особым маркером цветовой флуоресценции. Этот реагент позволяет выполнять одновременно определение и подсчет лимфоцитов CD2+(T11)[1-3] и CD19+ (B4)[2,4] в цельной крови при проточной цитометрии.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ И ПОЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов в периферической крови человека состоит из клеток трех типов: Т-клеток (образующихся в вилочковой железе), В-клеток (образующихся в костном мозге), и нулевых клеток.[5] Морфология данных клеток неразличима при микроскопии, однако, клетки различаются по антигенным характеристикам своих клеточных мембран.

Т-лимфоциты и В-лимфоциты играют центральную роль в работе иммунной системы. Различные подтипы Т-лимфоцитов могут распознавать специфические антигены, выполнять эффекторные функции и/или контролировать тип и интенсивность клеточного и/или гуморального иммунного ответа. В результате активации антигенами или макрофагами через Т-лимфоциты, специфические В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые вырабатывают и секретируют специфические иммуноглобулины (Ig).

В прошлом определение и подсчет Т- и В-лимфоцитов выполнялись с помощью таких клеточных маркеров, как рецепторы бараньих эритроцитов на Т-лимфоцитах (Е-розетка) и Ig на поверхностной мембране В-лимфоцитов.[6] Метод Е-розетки специфичен для определения Т-лимфоцитов, однако, он ограничен, поскольку предоставляет возможность только визуального определения и ручного подсчета комплексов бараньих эритроцитов с Т-лимфоцитами при световой микроскопии. Измерение Ig на поверхностной мембране для определения и подсчета В-лимфоцитов также имеет ограничения, поскольку другие популяции клеток могут иметь аналогичные Ig на поверхностной мембране и/или связывать Ig через рецепторы к Fc-фрагменту молекулы IgG, что приводит к получению недостоверных результатов.

В дальнейшем для определения и подсчета Т- и В-лимфоцитов были разработаны моноклональные антитела. В сравнении с относительно неспецифичными поликлональными антителами, вырабатываемыми к этим клеточным популяциям, моноклональные антитела определяют специфичные поверхностные антигены Т-клеток и В-клеток. Этим достигается не только более точное и воспроизводимое измерение количества лимфоцитов, но также определение стадий дифференцировки Т- и В-клеток при использовании в сочетании с другими клеточными маркерами (TdT, HLA-D-связанный антиген, Ig поверхностной мембраны).

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

Экспрессия всех поверхностных антигенов Т-лимфоцитов осуществляется в следующей последовательности: CD7 (ранний протимоцит); CD2 (средний протимоцит); CD5 (незрелый тимоцит), цитоплазматический CD3 (незрелый и промежуточный тимоцит) и CD3 (зрелый тимоцит).[2] Далее следует совместная экспрессия (промежуточный тимоцит) и раздельная экспрессия (зрелый тимоцит) клеточных поверхностных антигенов CD4 (индуцирующий) и CD8 (супрессорный/цитотоксический).[2] После экспрессии антигены CD7, CD2, CD5 и CD3, а также CD4 или CD8 экспрессируются совместно на протяжении оставшегося периода дифференцировки Т-лимфоцитов, включая неактивированные и активированные зрелые Т-лимфоциты периферической крови и лимфоидной ткани.

Экспрессия всех поверхностных антигенов В-лимфоцитов осуществляется в следующей последовательности: CD19 (коммитированный предшественник В-клеток/пре-пре-В-клетка); CD20 (ранний предшественник В-клеток).[2,4] После экспрессии антигены CD19 и CD20 экспрессируются совместно на протяжении оставшегося периода дифференцировки В-лимфоцитов (в том числе на неактивированных и активированных зрелых В-лимфоцитах периферической крови и лимфоидной ткани). Оба антигена исчезают на последней стадии дифференцировки В-лимфоцита (плазматической клетки).

CD21 (неактивированные зрелые В-лимфоциты периферической крови и лимфоидной ткани) и CD22 (предшественники В-клеток) представляют собой временные поверхностные антигены В-клеток, которые исчезают во время активации В-лимфоцитов периферической крови и лимфоидной ткани.[2,4] Поверхностной экспрессии CD22 предшествует экспрессия цитоплазматического CD22 (пре-пре-В-клетка).

Реагент моноклональных антител, специфичный ко всем поверхностным антигенам Т-клеток или В-клеток, можно использовать для определения и подсчета зрелых Т- или В-лимфоцитов соответственно. Реагент моноклональных антител, специфичный к конкретному клеточному поверхностному антигену, можно также использовать для определения зрелости (степени дифференцировки) и/или функционального состояния популяции лимфоцитов. В данном тесте моноклональные антитела T11 и B4 используются для определения и подсчета в периферической крови Т- и В-клеток с помощью общего поверхностного антигена Т-клеток и общего поверхностного антигена В-клеток, CD2 и CD19 соответственно. Кроме того, данный тест позволяет одновременно определять разные популяции лимфоцитов.

T11

Антиген CD2 связывается с рецептором Е-розетки, его молекулярный вес составляет 50 kd.[1,2] Это ранний поверхностный антиген, специфичный ко всем Т-клеткам, в норме он присутствует на некоторых протимоцитах костного мозга, более чем на 95% тимоцитов, на периферических Т-лимфоцитах, а также на субпопуляции натуральных киллеров.[1,2,7] После появления антиген CD2 экспрессируется в течение всей дифференцировки Т-лимфоцитов.[7] Антиген CD2 не определяется на В-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах и тромбоцитах.[2]

B4

Антиген CD19 представляет собой гликопротеин с молекулярным весом 95 kD.[2,4] Это ранний поверхностный антиген, специфичный к линии В-клеток, в норме он присутствует, начиная с ранних стадий развития предшественников В-клеток до последней стадии дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки.[2,4,7] Он определяется более, чем на 90% В-лимфоцитов, выделенных из периферической крови, селезенки, лимфатических узлов и миндалин, а также приблизительно на 5% клеток костного мозга.[4] В кроветворной системе этот антиген определяется только на нормальных и опухолевых В-клетках.[4] Антиген CD19 не определяется на Т-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах и тромбоцитах.[4,7]

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Т

В

Определение процентного содержания и абсолютного значения Т- и В-лимфоцитов можно использовать в качестве дополнительного метода оценки состояния иммунной системы при известных или неизвестных заболеваниях[8-16], а также для мониторинга уровней лимфоцитов после трансплантации органов.[12,17,18]

Например, определение патологических уровней Т- и В-лимфоцитов может помочь при диагностике и/или прогнозировании течения не установленных патологических состояний у пациентов с пониженным

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

количеством лейкоцитов. Подсчет Т- и В-лимфоцитов, в сочетании с определением CD4+ (индуцирующих) и CD8+ (супрессорных/цитотоксических) Т-лимфоцитов и соответствующих отношений CD4+/CD8+ можно использовать в качестве дополнительного средства при диагностике и прогнозировании иммунодефицита, в частности при инфицировании вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который является причиной синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД).[8,13-16] Процентное содержание Т- и/или В-лимфоцитов изменяется после трансплантации органов (почки, сердца, печени, легкого). Поэтому определение уровня Т- и/или В-лимфоцитов может быть полезным в качестве дополнительного способа мониторинга этих клеточных популяций.

ПРИНЦИПЫ ТЕСТА

Этот тест основан на способности моноклональных антител связываться с отдельными антигенными детерминантами на поверхности клетки. CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC представляет собой комбинацию двух мышиных моноклональных антител, каждое из которых специфично для отдельного поверхностного клеточного антигена. Специфичное окрашивание клеток осуществляется во время инкубации цельной крови с реагентом CYTO-STAT/COULTER CLONE. Оставшиеся в пробе лейкоциты анализируются методом проточной цитометрии с использованием гейтов лимфоцитов. Процентное содержание положительно окрашенных клеток определяется для каждого из четырех квадрантов: только положительная оранжевая флуоресценция, только положительная зеленая флуоресценция, двухцветное окрашивание, отсутствие окрашивания. Для оценки неспецифической фоновой флуоресценции использовались пробы цельной крови, окрашенные изотипическим контрольным реагентом CYTO-STAT/ COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC в двух экземплярах. (Этикетка для изотипического контрольного реагента должна соответствовать этикетке для моноклональных антител.)

РЕАГЕНТЫ

Смотрите таблицу страницe 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

В одном флаконе (0,5 mL) не содержащих антител реагентов содержится 0,2% BSA, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3, а также стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com***.

1. Данный реагент содержит азид натрия. Азид натрия в кислой среде образует азотисто-водородную кислоту, которая является крайне токсичным соединением. При утилизации азидные соединения необходимо смывать проточной водой. Данные меры предосторожности рекомендуется выполнять во избежание отложения в металлических трубах азидных соединений, являющихся взрывоопасными. При попадании на кожу или в глаза обильно промойте водой.
2. Не используйте антитела после истечения срока годности, указанного на этикетке.
3. С пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
4. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
5. Во время хранения или инкубации не подвергайте реагенты воздействию яркого света.
6. Длительность и температура инкубации и центрифугирования, отличные от указанных, могут привести к получению ошибочных результатов.
7. Избегайте микробной контаминации реагентов, в противном случае возможно получение неверных результатов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Не требуется. Моноклональные антитела и изотипические контрольные реагенты CYTO-STAT/ COULTER CLONE используются непосредственно из флакона, разбавление и центрифугирование не требуются.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты стабильны в течение периода, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Не замораживайте и не подвергайте воздействию света. Перед использованием доведите температуру всех реагентов до 20-25°C.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств реагента (обычно это прозрачная розовая жидкость) или значительные отклонения значений контрольных проб могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагент использовать нельзя.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

ОСТОРОЖНО: Стабильность проб крови крайне вариабельна. Для получения оптимальных результатов начинайте анализ в течение 6 часов после венепункции. До начала обработки температуру неокрашенной крови с добавлением антикоагулянта следует довести до 20-25°C. Не охлаждайте.

Получите пробу венозной крови методом венепункции, соблюдая правила асептики, в пробирку для сбора крови, используя соответствующий антикоагулянт (рекомендуется EDTA). Подробнее об особенностях сбора крови методом венепункции см. процедуры сбора образцов крови для диагностики методом венепункции ("Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Standard 4th Edition (H3-A4)," National Committee for Clinical Laboratory Standards (June 1998) Villanova, PA). Для каждого теста требуется 100 µL цельной крови. Для выполнения теста и контрольной пробы возьмите достаточное количество крови (от 1 до 2 mL в каждой пробирке); если требуется разведение, следует иметь в наличии аутологичную плазму. Подсчет лейкоцитов и определение жизнеспособности клеток необходимо выполнять для каждого образца венозной крови, используя установленную в лаборатории процедуру. Рекомендуемое значение жизнеспособности составляет 90%, однако в патологических образцах получение такого значения может быть затруднено.

ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT/ COULTER CLONE

ПОСТАВЛЯЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC
Моноклональные антитела.
REF 6603801 - 50 тестов (0,5 mL)

МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ

Реагент для лизиса эритроцитов (если необходим):

Комплект реагентов для лизиса цельной крови (Whole Blood Lysing Reagent Kit),
Ч.№ 6602764 - 100 тестов,
Ч.№ 6603152 - 300 тестов

Разбавитель (если необходим) – фосфатный буферизированный физиологический раствор (pH 7,2), Ч.№ 6603369

Моноклональные антитела CYTO-STAT/ COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56 (T-200)-FITC, Ч.№ 6603909 - 50 тестов (0,5 mL)

Изотипический контрольный реагент CYTO-STAT/ COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC, Ч.№ 6603796 - 50 тестов (0,5 mL)

Тестовые пробирки 12 x 75 mm

Пробирки для сбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется EDTA)

Переносящие пипетки

Микропипетки

Вортекс-миксер

Проточный цитометр

Счетчик клеток или гемоцитометр

ПРОЦЕДУРА

1. Оптимальное окрашивание достигается при количестве лейкоцитов в диапазоне 3-10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL). Если количество лейкоцитов превышает 10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL), то требуется разведение, если же количество лейкоцитов менее 3 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL), то требуется центрифугирование и повторное приготовление суспензии для достижения количества лейкоцитов 3-10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL). При использовании комплекта реагентов для лизиса цельной крови в качестве разбавителя рекомендуется использовать фосфатный буферизированный физиологический раствор (Ч.№ 6603369).

Патологические пробы

a. Высокое содержание лейкоцитов [> 10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL)]
   10-20 x 10^3: Разбавьте кровь 1:2.
   20-30 x 10^3: Разбавьте кровь 1:3.
   30-40 x 10^3: Разбавьте кровь 1:5.
   40-60 x 10^3: Разбавьте кровь 1:6.
   60-100 x 10^3: Разбавьте кровь 1:10.
   100-200 x 10^3: Разбавьте кровь 1:20.
b. Низкое содержание лейкоцитов [< 3 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL)] - метод лейкоцитарной пленки
   1) Центрифугируйте кровь при температуре 20-25°C со скоростью 500 x g в течение 5 минут.
   2) Удаляя лейкоцитарную пленку пипеткой Пастера, отберите некоторое количество эритроцитов и плазмы, чтобы убедиться, что все лейкоциты удалены.
   3) Полностью восстановите клеточную суспензию, перемешав пробу несколько раз пипеткой Пастера.
   4) Определите концентрацию клеток счетчиком клеток, или гемоцитометром.
   5) С помощью разбавителя доведите концентрацию клеток до 10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL). Добавьте 100 µL к антителам и выполните стандартную процедуру.
2. С каждой пробой необходимо обрабатывать соответствующий изотипический контрольный реагент. Для каждой пробы промаркируйте две тестовых пробирки 12 x 75 mm, одну для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

моноклональных антител, другую для изотипического контрольного реагента. Добавьте 10 µL изотипического контрольного реагента CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC или CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG1-RD1/ MsIgG1-FITC в промаркированные тестовые пробирки.

3. Добавьте 100 µL венозной крови в каждую тестовую пробирку. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы кровь не попала на верхнюю и боковые части тестовых пробирок, в противном случае лизис может быть неполным.
4. Осторожно перемешайте на вортексе. При использовании комплекта реагентов для лизиса цельной крови инкубируйте реактивные смеси при температуре 20-25°C в течение 45-47 минут.

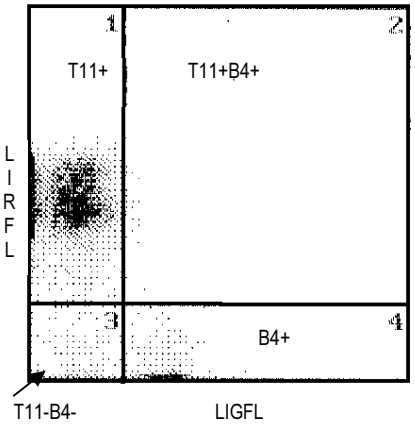
ВАЖНО: Капли крови, оставшиеся вокруг верхней части пробирки, необходимо удалить, так как в противном случае нелизированные эритроциты могут контаминировать конечную пробу и исказить результаты. Для удаления капель крови используйте аппликаторы с ватными наконечниками.

5. Лизируйте эритроциты в каждой тестовой пробирке, используя рекомендуемую процедуру для лизирующей методики в наборе реагентов для лизирования цельной крови.
6. Проанализируйте клетки на проточном цитометре с возможностью двухцветного флуоресцентного анализа, правильно стандартизованном и с выполненным гейтированием лимфоцитов в соответствии с руководством по эксплуатации прибора. Чтобы свести к минимуму возможность получения субоптимальных результатов, анализируйте окрашенные клетки без задержек.
   a. Значения флуоресценции проточной цитометрии необходимо регистрировать на логарифмической шкале.
   b. Световое рассеяние под прямым углом (FALS) можно регистрировать на линейной шкале. Световое рассеяние под углом 90° (90°LS) можно регистрировать на логарифмической или линейной шкале.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ

ОСТОРОЖНО: Если лазер проточного цитометра не настроен, или гейты настроены неверно, возможно получение ошибочных результатов.

1. Получите гистограмму зависимости SS (90°LS) от FALS. Достаточным является получение трехчастного дифференциала.
2. Получите логарифмическую гистограмму зеленой [LFL1 (FITC)] или оранжевой [LFL2 (RD1)] флуоресценции, гейтированную по 90°LS и гистограмму FALS, гейтированную по лимфоцитам. Процентные значения положительных популяций можно получить, определив отчетливый пик флуоресценции (один цвет) или настроив статистику по квадрантам (два цвета). Подробнее см. в руководстве по эксплуатации прибора.
3. На следующей гистограмме представлен пример анализа нормальной пробы на проточном цитометре COULTER EPICS с гейтированием по лимфоцитам. 98±1% клеток, неспецифически окрашенных с использованием изотипического контрольного реагента, были исключены путем установки квадрантов.
4. Процентное содержание положительно окрашенных клеток CD2+ [T11+] получено в квадранте 1. Процентное содержание положительно окрашенных клеток CD19+ (B4+) получено в квадранте 4. Процентное содержание клеток с двойным положительным окрашиванием CD2+/CD19+ [T11+/B4+] получено в квадранте 2.
5. Об использовании изотипических контрольных реагентов при анализе результатов проточной цитометрии см. в разделе ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.



АБСОЛЮТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для расчета абсолютных значений используется следующая формула:

Абсолютное значение [клеток/mm^3 (или клеток/µL)] = Общее число лейкоцитов [клеток/mm^3 (или клеток/µL)] x % лимфоцитов x % положительно окрашенных клеток/10^4

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для обеспечения правильной работы для получения положительных контрольных проб необходимо использовать обычных, практически здоровых доноров. Нормальные диапазоны следует устанавливать для местной популяции здоровых доноров.

Флуорохромы флуоресцин и фикоэритрин (RD1) испускают свет с разной длиной волны, однако их спектры частично перекрываются, поэтому необходима коррекция с помощью электронной компенсации. Оптимальные уровни компенсации могут быть получены при анализе двухпараметрической гистограммы донорских клеток, окрашенных каждым из флуорохромов по отдельности. При этом анализе выполняется регулировка для обеспечения отсутствия окрашивания в двухцветном квадранте (квадрант 2) с любым отдельным флуорохромом.

Влияние специфичных и/или неспецифичных антител, связывающихся с моноцитами и гранулоцитами в пробе через Fc-фрагмент, можно исключить, выполнив правильное гейтирование лимфоцитов на проточном цитометре.

Чтобы правильно исключить из гейта моноциты, реагент моноклональных антител CD14/CD45, такой как CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56 (T-200)-FITC (Ч.№ 6603909 - 50 тестов) необходимо обрабатывать с каждой пробой для правильной оценки растрового изображения гейта.[19]

Изотипический контрольный реагент CYTO-STAT/ COULTER CLONE используется для исключения в каждой пробе влияния неспецифичных антител, связывающихся с лимфоцитами через Fc-фрагмент. Популяция положительно окрашенных лимфоцитов с яркой флуоресценцией измеряется в гейтах, настроенных на исключение низкого уровня неспецифической флуоресценции.

Неспецифическая флуоресценция (при использовании квадрантов для исключения 98±1% неспецифического окрашивания) у здоровых субъектов обычно составляет 2% или меньше. Если фоновый уровень в квадрантах 1, 2 или 4 для любой контрольной пробы превышает 2%, то результаты теста могут быть ошибочными.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для получения оптимальных результатов пробы крови необходимо окрашивать в течение 6 часов после сбора. Перед окрашиванием или анализом выдержите пробы в пробирках для сбора крови при комнатной температуре. Не охлаждайте. При анализе длительно хранящихся или охлажденных проб возможно получение недостоверных результатов. Чтобы свести к минимуму возможность получения субоптимальных результатов, анализируйте окрашенные клетки без задержек.
2. Рекомендуемая жизнеспособность клеток для образцов венозной крови составляет 90%, однако, получение такого значения может быть затруднено для некоторых патологических образцов.
3. Длительное взаимодействие клеток с лизирующими реагентами может привести к разрушению лейкоцитов и потере клеток интересующей популяции.
4. Не все эритроциты могут лизироваться в следующих случаях: ядросодержащие эритроциты, патологическая концентрация белка, гемоглобинопатия. Это может привести к ложному снижению результатов, поскольку нелизированные эритроциты будут подсчитаны как лейкоциты.
5. Этот реагент предназначен для использования с препаратами цельной крови. Не рекомендуется использовать его с препаратами свежих или замороженных мононуклеарных клеток.
6. Не разбавляйте, не используйте по частям и не замораживайте этот реагент. Используйте только в том виде, в котором он упакован.
7. Данный реагент предназначен только для проточной цитометрии.
8. Патологические состояния организма не всегда сопровождаются патологическими изменениями процентного содержания популяций лейкоцитов. При патологических состояниях может отмечаться такое же процентное соотношение лейкоцитов, как у здорового человека. Используйте результаты теста в сочетании с клиническими и другими диагностическими данными.
9. У определенных пациентов изменение или выраженное снижение числа клеток определенных клеточных популяций может вызывать специфические нарушения.
10. При проточной цитометрии возможно получение ошибочных результатов, если лазер не настроен или неправильно настроены гейты.
11. Ввиду значительных различий между разными лабораторными методами определения абсолютных значений лимфоцитов необходима оценка точности используемого метода.[20]

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Реагент моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC использовался с пробами крови, полученными от популяции практически здоровых мужчин и женщин. Популяция была географически неоднородна и включала субъектов из восточных, юго-восточных, средне-западных, северо-западных и юго-западных штатов США, вне зависимости от расы и в возрасте 21-95 лет. Пробы окрашивались моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/ B4-FITC. Нормальные значения клеток T11+ и B4+, определенные методом проточной цитометрии (COULTER EPICS PROFILE, гейтирование по

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лимфоцитам) при анализе цельной крови, приведены в следующей таблице. Для каждой пробы было получено количество лейкоцитов и 3 популяции дифференцировки. Значения выражены в процентах (%) от общего количества лимфоцитов и в абсолютных значениях [клеток/mm^3 (или клеток/µL)]. Эти значения приведены только для справки. В каждой лаборатории необходимо определить собственные ожидаемые значения, используя местную популяцию здоровых доноров.

	ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ			
	Число	Мин.	Макс.	Среднее ±1SD
%T11+ лимфоцитов	30	67	87	78,4 ±4,9
% лимфоцитов B4+	30	5	15	9,3 ±2,2
Абсолютное значение T11+	30	1020	2041	1479,2 ±270,1
Абсолютное значение B4+	30	81	271	177,3 ± 48,2

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD2 является ранним поверхностным антигеном, он специфичен ко всем Т-клеткам, в норме он присутствует на некоторых протимоцитах костного мозга, более чем на 95% тимоцитов, на периферических Т-лимфоцитах, а также на субпопуляции натуральных киллеров.[1,2,7] После появления антиген CD2 экспрессируется в течение всей дифференцировки Т-лимфоцитов.[7] Антиген CD2 не определяется на В-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах и тромбоцитах.[2]

Антиген CD19 является ранним поверхностным антигеном, специфичным к линии В-клеток, в норме он присутствует, начиная с ранних стадий развития предшественников В-клеток до последней стадии дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки.[2,4] Он определяется более чем на 90% В-лимфоцитов, выделенных из периферической крови, селезенки, лимфатических узлов и миндалин, а также приблизительно на 5% клеток костного мозга.[4] В кроветворной системе этот антиген определяется только на нормальных и опухолевых В-клетках.[4] Антиген CD19 не определяется на Т-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах и тромбоцитах.[4,7]

Для оценки клеточной перекрестной реактивности моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC определялись в пробах крови здоровых взрослых доноров. Результаты наглядно показали, что данные реагенты специфично реагируют с лимфоцитами и не реагируют с моноцитами и гранулоцитами.

Описание способов контроля специфического и неспецифического окрашивания моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC см. в разделе ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.

КОРРЕЛЯЦИЯ

Лизированная цельная кровь здоровых доноров с моноклональными антителами COULTER CLONE T11-RD1, COULTER CLONE B4 и CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC анализировалась методом проточной цитометрии (COULTER EPICS C, гейтирование по лимфоцитам). Полученные данные (см. таблицу ниже) подтвердили предположение об эквивалентной реактивности этих реагентов в отношении Т- и В-лимфоцитов периферической крови. Результаты выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

	ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ			
Реагент	Число	Мин.	Макс.	Среднее ±1SD
T11-RD1	9	74	85	80,8 ±4,1
T11-RD1/B4-FITC [фракция T11-RD1]	9	75	86	81,3 ±3,4
B4-FITC	9	9	14	11,1 ±1,9
T11-RD1/B4-FITC [фракция B4-FITC]	9	7	13	9,3 ±1,8

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ИЗМЕРЕНИЙ

В течение дня

На проточном цитометре COULTER EPICS PROFILE для каждой из трех концентраций лимфоцитов T11+ и B4+ в течение одного дня выполнялось тридцать одно измерение. Для получения различных концентраций линия клеток T11+ (PB44) разбавлялась линией клеток B4+ (PB11). Клетки окрашивались реагентами моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC. Результаты выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

Концентрация	Число	Средний % T11+	±1 SD	%CV	Средний % B4+	±1 SD	%CV
1	31	17,9	0,8	4,2	7,5	0,5	6,7
2	31	64,2	0,6	1,0	36,8	0,9	2,5
3	31	92,3	0,5	0,6	81,9	1,0	1,2

Между лабораториями

Исследования выполнялись в один и тот же день в трех разных лабораториях COULTER Immunology с использованием разных проточных цитометров COULTER. На одном приборе выполнялось одиннадцать повторных измерений. Для всех измерений использовалась одна проба крови от одного здорового донора. Проба крови разделялась на три части, каждая из которых окрашивалась реагентом моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC. Результаты выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

Лаборатория/прибор	Число	Средний % T11+	±1 SD	%CV	Средний % B4+	±1 SD	%CV
1 (EPICS PROFILE I)	11	73,2	0,8	1,1	13,1	0,7	5,3
2 (EPICS PROFILE II)	11	75,0	0,7	0,9	13,4	0,6	4,5
3 (EPICS 753)	11	73,2	0,9	1,2	12,7	0,4	3,1

ИЗБРАННЫЕ ССЫЛКИ

1. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds: 1984. Leukocyte Typing. New York: Springer-Verlag. p. 26, 28, 41-42,196, 201, 215-216.
2. McMichael AJ, ed: 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press. p. 38-40, 42, 106-107, 116, 199, 302-306, 308, 315, 475.
3. Reinherz, EL, Haynes, BF, Nadler, LM and Bernstein, ID: 1986. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag. Vol. 1. p. 6, 16, 364-365.
4. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID: 1986. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag. Vol 2, p. 8, 15-25, 37.
5. Reinherz EL and Schlossman SF: 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19: 821-827.
6. Aiuta F, Cerottini J-C, Coombs RRA, Cooper M, Dickler HB, Froland S, Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig J, Preud'homme J-L, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegal FP, Stjernsward J, Terry WD and Wybran J: 1975. Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies (IUIS), Report - July 1974. Clin Immunol and Immunopathol 3: 584-597.
7. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF and Schlossman SF: 1983. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. J Immunol 131: 244-250.
8. Benjamini E and Leskowitz S: 1991. Disorders of the Immune Response. In: Immunology: A Short Course. Second Edition. New York: Wiley-Liss. p. 211-244.
9. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF: 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol 125: 1269-1274.
10. Felsenstein D, Carney WP, Iacoviello VR and Hirsch MS: 1985. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152: 198-203.
11. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL: 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun 40: 472-477.
12. Goldstein G, Lifter J and Mittler R: 1982. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Fabre JW, eds. New York, NY: Academic Press. p. 39-70.
13. Schmidt RE: 1989. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. Blut 59: 200-206.
14. de Martini RM and Parker JW: 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3: 56-70.
15. Fauci AS: 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239: 617-622.
16. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV: 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2: 114-124.
17. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, WhitmanJ, Coral F, Ritz J and Nadler LM: 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood 74: 2203-2211.
18. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB: 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47: 465-471.
19. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA: 1990. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 11: 453-459.
20. Koepke JA and Landay AL: 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52: 19-27.

ДОСТУПНОСТЬ ПРОДУКТА

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1/B4-FITC
Моноклональные антитела,
REF 6603801 - 50 тестов (0,5 mL)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

По вопросам качества продукции обращаться к
представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Редакция MB, 09/2013

Изменения были внесены в:

- ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT/COULTER CLONE
- РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ

Редакция MC, 11/2014

Изменения были внесены в:

- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Версия MD, 06/2016

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- Обновленный адрес представительства в ЕС
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT/ COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC

REF 6603802 - 50 тестов

Ч.№ 4235854-LE

CE BECKMAN COULTER

	T4-RD1	T8-FITC
Специфичность	CD4	CD8
Клон	SFCI12T4D11[5,6,24,25]	SFCI21Thy2D3[6,7,24,25]
Гибридома	NS/1-AG4 x BALB/c	NS/1-AG4 x BALB/c
Иммуноген	Человеческие периферические Т-лимфоциты	Человеческие тимоциты
Цепь Ig	IgG1[25]	IgG1[25]
Вид	Мышь	Мышь
Источник	Кондиционированная среда	Кондиционированная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 486-575 nm / Излучение при 568-590 nm	Возбуждение при 468-509 nm / Излучение при 504-541 nm
Конъюгация	RD1 (Фикоэритрин)	FITC (Флуоресцин изотиоцианат)
Молярное отношение	RD1/Белок: 0,5-1,5	FITC/Белок: 5-10
Определение светорассеивания	Переднее и (или) боковое	Переднее и (или) боковое

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

CYTO-STAT/COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC представляет собой реагент с двойной флуоресценцией, состоящий из мышиных моноклональных антител Т4 (CD4)[1] и Т8 (CD8)[1]. Каждое из антител помечено особым маркером цветовой флуоресценции. Данный реагент используется для одновременного определения и подсчета процентного содержания лимфоцитов Т4+ (индуцирующих) и Т8+ (супрессорных/ цитотоксических) в периферической крови методом проточной цитометрии.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ И ПОЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов в периферической крови человека состоит из клеток трех типов – Т-клеток (образующихся в вилочковой железе), В-клеток (образующихся в костном мозге), и нулевых клеток. Морфология данных клеток неразличима при микроскопии, однако клетки различаются по антигенным характеристикам своих клеточных мембран.

Различают два основных типа Т-лимфоцитов (в соответствии с функцией и поверхностными белками). Это индуцирующие (Т4+) и супрессорные/цитотоксические (Т8+) Т-лимфоциты.[2,3]

Т4

Молекулярный вес антигена Т4 составляет 62 kD.[1,4] В норме он присутствует на поверхности большинства (приблизительно 80%)[5] тимоцитов и приблизительно на 60% Т-лимфоцитов периферической крови.[4] Лимфоциты Т4+ играют центральную роль в регуляции иммунного ответа.[2,3] В периферической крови лимфоциты Т4+ выполняют индуцирующую функцию при взаимодействии между Т- и Т-клетками, Т- и В-клетками, а также Т-клетками и макрофагами.[6] Антиген Т4 реагирует с антигеном главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса II на клетках-мишенях.[4]

Т8

Молекулярный вес антигена Т8 составляет 76 kD.[1,4] В норме он присутствует на поверхности большинства (приблизительно 80%)[7] тимоцитов и приблизительно на 30-35% Т-лимфоцитов периферической крови.[4,7] Благодаря супрессорному и цитотоксическому действию лимфоциты Т8+ играют центральную роль в регуляции иммунного ответа.[2,3,6] Антиген Т8 реагирует с антигеном главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I на клетках-мишенях.[4]

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Т4

Определение патологических уровней лимфоцитов Т4+ может помочь при диагностике и/или прогнозировании течения иммунодефицитных заболеваний, таких как агаммаглобулинемия, аплазия вилочковой железы (синдром Ди Джорджи), тяжелый сочетанный иммунодефицит, а также синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).[8-10]

Инфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который является причиной СПИД, приводит к выраженной иммуносупрессии в основном за счет того, что снижается содержание лимфоцитов Т4+, на которых имеются рецепторы к вирусу (антиген Т4).[11] Прогрессирование клинического и иммунологического ухудшения в основном коррелирует со снижением содержания лимфоцитов Т4+.[10]

Т8

Определение патологических уровней лимфоцитов Т8+ может помочь при диагностике и/или прогнозировании течения иммунодефицитных заболеваний, таких как агаммаглобулинемия, аплазия вилочковой железы (синдром Ди Джорджи), а также тяжелый сочетанный иммунодефицит.[8,9] Повышение уровней клеток Т8+ наблюдается при таких инфекциях, как гепатит В, инфицирование вирусом Эпштейна-Барра и цитомегаловирусами, и поэтому может использоваться в диагностических и/или прогностических целях.[10,12]

Т4/Т8

Вызванные заболеванием изменения уровня лимфоцитов Т4+ и/или Т8+ могут изменять отношение индуцирующих и супрессорных/цитотоксических клеток Т4/Т8. Поэтому определение отношения Т4/Т8 может быть полезным при диагностике и/или прогнозировании состояния иммунной системы.

Определение отношения Т4/Т8 в сочетании с подсчетом лимфоцитов Т4+ является лабораторным показателем, наиболее часто используемым при СПИД.[10,13] У пациентов с поздними стадиями СПИД отношение Т4/Т8 приближается к нулю, а лимфоциты Т4+ не определяются.[10] При этом уровень лимфоцитов Т8+ может быть нормальным, повышенным или пониженным.

Изменения отношения Т4/Т8 и уровней лимфоцитов Т4+ и Т8+ могут отмечаться при аутоиммунных заболеваниях, таких как рассеянный склероз (РС) и системная красная волчанка (СКВ). Увеличение отношения Т4/Т8 и снижение числа лимфоцитов Т4+ и Т8+ описано у пациентов с прогрессирующим (активным) РС.[14-16] При СКВ динамика лимфоцитарного ответа в общих чертах отражает клиническую активность заболевания и степень поражения внутренних органов.[17-21] Например, повышение отношения Т4/Т8 и повышение процентного содержания лимфоцитов Т4+ наблюдаются в активной/неактивной фазе СКВ при мультисистемном поражении, включающем лимфаденопатию, однако без значимого поражения почек.[17,18] В активной фазе у таких пациентов также описано повышенное отношение Т4/Т8 со снижением процентного содержания лимфоцитов Т8+.[19] Повышение процентного содержания лимфоцитов Т4+ и снижение процентного содержания лимфоцитов Т8+ отмечается у пациентов с активной формой СКВ при поражении центральной нервной системы, но без поражения почек.[20] С другой стороны, снижение отношения Т4/Т8 и снижение процентного содержания лимфоцитов Т4+ описано у пациентов с активной/ неактивной формой СКВ, у которых заболевание манифестировало тяжелым поражением почек и/или тромбоцитопенией.[17,18] У других пациентов с активной/неактивной формой СКВ определялось одновременное снижение процентного содержания лимфоцитов Т4+ и повышение процентного содержания лимфоцитов Т8+.[21] И наконец, нормальное отношение Т4/Т8 наблюдается у пациентов с распространенной СКВ, при которой часто поражаются почки и центральная нервная система.[17,18]

Повышение отношения Т4/Т8 обнаружено у пациентов с аплазией вилочковой железы.[8]

Снижение процентного содержания лимфоцитов Т4+ и повышение процентного содержания лимфоцитов Т8+ без значимых изменений отношения Т4/Т8 наблюдается у пациентов со стабильной функцией аллотрансплантата после трансплантации почки.[22]

Снижение отношения Т4/Т8 и процентного содержания лимфоцитов Т4+ документировано у пациентов во время фенотипического восстановления после аутологической трансплантации очищенных клеток костного мозга.[23]

ПРИНЦИПЫ ТЕСТА

Этот тест основан на способности моноклональных антител связываться с отдельными антигенными детерминантами на поверхности клетки. CYTO-STAT/ COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC представляет собой комбинацию двух мышиных моноклональных антител, каждое из которых специфично для отдельного поверхностного клеточного антигена. Специфичное окрашивание клеток осуществляется во время инкубации цельной крови с двухцветным реагентом CYTO-STAT/COULTER CLONE. Оставшиеся после лизиса эритроцитов лейкоциты анализируются методом проточной цитометрии с использованием гейтов лимфоцитов. Процентное содержание положительно окрашенных лимфоцитов определяется для каждого из четырех квадрантов: только

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

положительная красная флуоресценция, только положительная зеленая флуоресценция, двухцветное окрашивание, отсутствие окрашивания. Для оценки неспецифической фоновой флуоресценции использовались пробы цельной крови, окрашенные изотипическим контрольным реагентом CYTO-STAT/ COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC в двух экземплярах. (Этикетка для изотипического контрольного реагента должна соответствовать этикетке для моноклональных антител.)

РЕАГЕНТЫ
Смотрите таблицу странице 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ
Концентрация антител — 0,28/0,14 µg/тест.

Конечная концентрация (0,5 mL) не содержащих антител реагентов в одном флаконе составляет 0,2% BSA, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3, а также стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com***.

1. Данный реагент содержит азид натрия. Азид натрия в кислой среде образует азотисто-водородную кислоту, которая является крайне токсичным соединением. При утилизации азидные соединения необходимо смывать проточной водой. Данные меры предосторожности рекомендуется выполнять во избежание отложения в металлических трубах азидных соединений, являющихся взрывоопасными. При попадании на кожу или в глаза обильно промойте водой.
2. Не используйте антитела после истечения срока годности, указанного на этикетке.
3. С пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
4. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
5. Во время хранения или инкубации не подвергайте реагенты воздействию яркого света.
6. Длительность и температура инкубации и центрифугирования, отличные от указанных, могут привести к получению ошибочных результатов.
7. Избегайте микробной контаминации реагентов, в противном случае возможно получение неверных результатов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ
Не требуется. Моноклональные антитела и изотипические контрольные реагенты CYTO-STAT/ COULTER CLONE используются непосредственно из флакона, разбавление и центрифугирование не требуются.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ
Реагенты стабильны в течение периода, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Не замораживайте и не подвергайте воздействию света. Перед использованием доведите температуру всех реагентов до 20-25°C.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ
Любые изменения физических свойств реагентов (в норме это прозрачная розовая жидкость) или значительные отклонения значений контрольных проб могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагенты использовать нельзя.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

ОСТОРОЖНО: Стабильность проб крови крайне вариабельна. Для получения оптимальных результатов начинайте анализ в течение 6 часов после венепункции. До начала обработки температуру неокрашенной крови с добавлением антикоагулянта следует довести до 20-25°C. Не охлаждайте.

Получите пробу венозной крови методом венепункции, соблюдая правила асептики, в пробирку для сбора крови, используя соответствующий антикоагулянт (рекомендуется EDTA). За подробной информацией о сборе цельной крови венепункцией и влияющих на него условиях, обратитесь к опубликованному Clinical and Laboratory Standards Institute "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3), Approved Edition". Для каждого теста необходимо 100 µL цельной крови. Для выполнения теста и контрольной пробы возьмите достаточное количество крови (от 1 до 2 mL в каждой пробирке); если требуется разведение, следует иметь в наличии аутологичную плазму. Необходимо выполнять подсчет лейкоцитов.

ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT/ COULTER CLONE

ПОСТАВЛЯЕМЫЙ МАТЕРИАЛ
Моноклональные антитела CYTO-STAT/ COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC,
REF 6603802 - 50 тестов (0,5 mL)

МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ
Реагент для лизиса эритроцитов (если необходим):

Комплект реагентов для лизиса цельной крови (Whole Blood Lysing Reagent Kit),
Ч.№ 6602764 - 100 тестов
Ч.№ 6603152 - 300 тестов

Разбавитель (если необходим) - фосфатный буферизированный физиологический раствор (pH 7,2), Ч.№ 6603369

Изотипический контрольный реагент CYTO-STAT/ COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC, Ч.№ 6603796 - 50 тестов (0,5 mL)

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

тест-пробирки 12 x 75 mm

Пробирки для сбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется EDTA)

Переносящие пипетки

Вортекс-миксер

Проточный цитометр (Обратитесь к главе Требуемое оборудование)

Счётчик клеток или гемацитометр

Микропипетки

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

ПРОЦЕДУРА
1. Оптимальное окрашивание достигается при количестве лейкоцитов в диапазоне 3-10 x 10^6 клеток/mL. Если количество лейкоцитов превышает 10 x 10^6 клеток/mL, то требуется разведение, если же количество лейкоцитов менее 3 x 10^6 клеток/mL, то требуется центрифугирование и повторное приготовление суспензии для достижения количества лейкоцитов 3-10 x 10^6 клеток/mL. При использовании комплекта реагентов для лизиса цельной крови в качестве разбавителя рекомендуется использовать фосфатный буферизированный физиологический раствор (Ч.№ 6603369).

Патологические пробы
a. Высокое содержание лейкоцитов (>10 x 10^6 клеток/mL)
   10-20 x 10^6: Разбавьте кровь разбавителем 1:2.
   20-30 x 10^6: Разбавьте кровь разбавителем 1:3.
   30-40 x 10^6: Разбавьте кровь разбавителем 1:5.
   40-60 x 10^6: Разбавьте кровь разбавителем 1:6.
   60-100 x 10^6: Разбавьте кровь разбавителем 1:10.
   100-200 x 10^6: Разбавьте кровь разбавителем 1:20.

b. Низкое содержание лейкоцитов (<3 x 10^6 клеток/mL) – метод лейкоцитарной пленки
   1) Центрифугируйте кровь при температуре 20-25°C со скоростью 500 x g в течение 5 минут.
   2) Удаляя лейкоцитарную пленку пипеткой Пастера, отберите некоторое количество эритроцитов и плазмы, чтобы убедиться, что все лейкоциты удалены.
   3) Полностью восстановите клеточную суспензию, перемешав пробу несколько раз пипеткой Пастера.
   4) Определите концентрацию клеток, используя счётчик клеток или гемацитометр.
   5) С помощью разбавителя доведите концентрацию клеток до 10 x 10^6 клеток/mL. Добавьте 100 µL к разбавленным антителам и выполните стандартную процедуру.

2. С каждой пробой необходимо обрабатывать соответствующий изотипический контрольный реагент. Для каждой пробы промаркируйте две тестовых пробирки 12 x 75 mm, одну для моноклональных антител, другую для изотипического контрольного реагента. Добавьте 10 µL реагента CYTO-STAT/COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC или изотипического контрольного реагента CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC в промаркированные тестовые пробирки.
3. Добавьте 100 µL венозной крови в каждую тестовую пробирку. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы кровь не попала на верхнюю и боковые части тестовых пробирок, в противном случае лизис может быть неполным.
4. Осторожно перемешайте на вортексе. При использовании комплекта реагентов для лизиса цельной крови инкубируйте реактивные смеси при температуре 20-25°C в течение 45-47 минут.

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

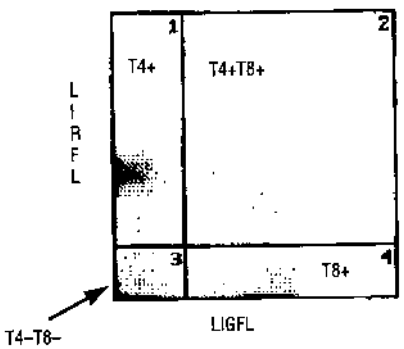
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Лизируйте эритроциты в каждой тестовой пробирке, используя рекомендуемую процедуру для лизирующей методики в наборе реагентов для лизирования цельной крови.
6. Проанализируйте клетки на проточном цитометре с возможностью двухцветного флуоресцентного анализа, правильно стандартизованном и с выполненным гейтированием лимфоцитов в соответствии с руководством по эксплуатации прибора. Для обеспечения максимальной жизнеспособности клеток анализируйте окрашенные клетки без задержек.
   a. Значения флуоресценции проточной цитометрии необходимо регистрировать на логарифмической шкале.
   b. Световое рассеяние под прямым углом (FALS) можно регистрировать на линейной шкале. Световое рассеяние под углом 90° (90°LS) можно регистрировать на логарифмической или линейной шкале.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ

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

1. Получите гистограмму зависимости 90°LS от FALS. Достаточным является получение трехчастного дифференциала.
2. Получите логарифмическую гистограмму зеленой или красной (LIGFL and LIRFL) флуоресценции, гейтированную по 90°LS и гистограмму FALS, гейтированную по лимфоцитам. Процентные значения положительных популяций можно получить, определив отчетливый пик флуоресценции (один цвет) или настроив статистику по квадрантам (два цвета). Подробнее см. в руководстве по эксплуатации прибора.
3. На следующей гистограмме представлен пример анализа нормальной пробы на проточном цитометре COULTER EPICS с гейтированием по лимфоцитам. 98 ±1% клеток, неспецифически окрашенных с использованием изотипического контрольного реагента, были исключены путем установки квадрантов.
4. Об использовании изотипических контрольных реагентов при анализе результатов проточной цитометрии см. в разделе ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.



АБСОЛЮТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для расчета абсолютных значений используется следующая формула:

Абсолютное значение = Общее число лейкоцитов (клеток/mm^3) x % лимфоцитов x % положительно окрашенных клеток/10^4

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Контрольные клетки COULTER CYTO-TROL (Ч.№ 6604248) необходимо использовать в качестве положительного контрольного материала для обеспечения правильных условий работы. С другой стороны, для обеспечения правильной работы для получения положительных контрольных проб можно использовать пробы от обычных, практически здоровых доноров. Нормальные диапазоны следует устанавливать для местной популяции здоровых доноров.

Влияние специфичных и/или неспецифичных антител, связывающихся с моноцитами и гранулоцитами в пробе через Fc-фрагмент, можно исключить, выполнив правильное гейтирование лимфоцитов на проточном цитометре.

Изотипический контрольный реагент CYTO-STAT/COULTER CLONE используется для исключения в каждой пробе влияния неспецифичных антител, связывающихся с лимфоцитами через Fc-фрагмент. Популяция положительно окрашенных лимфоцитов с яркой флуоресценцией измеряется в гейтах, настроенных на исключение низкого уровня неспецифической флуоресценции.

Неспецифическая флуоресценция (при использовании квадрантов для исключения 98 ±1% неспецифического окрашивания) у здоровых субъектов обычно составляет 1-2% или меньше. Повышенные значения могут определяться при некоторых злокачественных заболеваниях. Если фоновый уровень в квадрантах 1, 2 или 4 для любой контрольной пробы превышает 1-2%, то результаты теста могут быть ошибочными.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для получения оптимальных результатов пробы крови необходимо окрашивать в течение 6 часов после сбора. Перед окрашиванием или анализом выдержите пробы в пробирках для сбора крови при комнатной температуре. Не охлаждайте. При анализе длительно хранящихся или охлажденных проб возможно получение недостоверных результатов. Для обеспечения максимальной жизнеспособности клеток анализируйте окрашенные клетки без задержек.
2. У определенных пациентов изменение или выраженное снижение числа клеток определенных клеточных популяций может вызывать специфические нарушения.
3. Не разбавляйте, не используйте по частям и не замораживайте эти реагенты. Используйте только в том виде, в котором они упакованы.
4. Эти реагенты предназначены только для проточной цитометрии.
5. Эти реагенты предназначены для использования с препаратами цельной крови. Их не рекомендуется использовать с препаратами свежих или замороженных мононуклеарных клеток.
6. Патологические состояния организма не всегда сопровождаются патологическими изменениями процентного содержания популяций лейкоцитов. При патологических состояниях может отмечаться такое же процентное соотношение лейкоцитов, как у здорового человека. Используйте результаты теста в сочетании с клиническими и другими диагностическими данными.
7. Не все эритроциты могут лизироваться в следующих случаях: ядросодержащие эритроциты, патологическая концентрация белка, гемоглобинопатия. Это может привести к ложному снижению результатов, поскольку нелизированные эритроциты будут подсчитаны как лейкоциты.
8. Длительное взаимодействие клеток с лизирующими реагентами может привести к разрушению лейкоцитов.
9. При проточной цитометрии возможно получение ошибочных результатов, если лазер не настроен или неправильно настроены гейты.
10. Ввиду значительных различий между разными лабораторными методами определения абсолютных значений лимфоцитов необходима оценка точности используемого метода.[26]

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Пробы крови были взяты в популяции практически здоровых мужчин и женщин. В эту популяцию входили взрослые субъекты разных рас в возрасте от 19 до 65 лет. Пробы окрашивались моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC. Нормальные значения клеток T4+ и T8+, определенные методом проточной цитометрии (COULTER EPICS Profile, гейтирование по лимфоцитам) при анализе цельной крови, приведены в следующей таблице. Подсчет лейкоцитов выполнялся на приборе COULTER S-Plus IV. Значения выражены в % от общего количества лимфоцитов и в абсолютных значениях (клеток/mm^3). Эти значения приведены только для справки. В каждой лаборатории необходимо определить собственные ожидаемые значения, используя местную популяцию здоровых доноров.

	ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ			
	Число	**Мин.**	**Макс.**	**Среднее ±1 SD**
% лимфоцитов T4+	25	35	62	46 ±6
% лимфоцитов T8+	25	17	43	27 ±6
Абсолютное значение клеток T4+	25	575	1734	989 ±287
Абсолютное значение клеток T8+	25	327	1148	573 ±193

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Каждая партия CYTO-STAT/COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC тщательно проверена при анализе лимфоцитов в рамках подробных тестовых протоколов контроля качества. Пробы для тестирования контроля качества были взяты в популяции наших сотрудников, включающей чернокожих, белых, азиатов и латиноамериканцев. Результаты продемонстрировали, что моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC специфично реагируют с лимфоцитами.

Описание способов контроля неспецифического окрашивания моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC см. в разделе ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.

КОРРЕЛЯЦИЯ

Пробы пяти здоровых доноров тестировались в трех экземплярах с использованием моноклональных антител COULTER CLONE T4-RD1, COULTER CLONE T8-FITC и CYTO-STAT/COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC в лизированной цельной крови методом проточной цитометрии. Полученные данные (см. таблицу ниже) подтвердили предположение об эквивалентной реактивности этих реагентов в отношении лимфоцитов периферической крови. Результаты выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

	ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ		
Реагент	**Средний %**	**±1 SD**	**%CV**
T4-RD1	48	3	6
T8-FITC	24	4	17
T4-RD1/T8-FITC (фракция T4-RD1)	54	3	5
T4-RD1/T8-FITC (фракция T8-FITC)	23	3	13

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ИЗМЕРЕНИЙ

В течение дня

На проточном цитометре COULTER EPICS Profile для каждой из трех концентраций лимфоцитов T4+ и T8+ в течение одного дня выполнялось тридцать одно измерение. Для получения различных концентраций линия клеток T4+T8+ (PB44) разбавлялась линией клеток T4–T8– (PB11). Клетки окрашивались моноклональными антителами CYTO-STAT/ COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC. Результаты выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

	Средний %			Средний %		
Концентрация	**T4+**	**±1 SD**	**%CV**	**T8+**	**±1 SD**	**%CV**
1	6	1	17	9	1	11
2	42	1	2	61	1	2
3	71	1	1	98	1	1

Межлабораторные сличения

Исследования выполнялись в один и тот же день в трех разных лабораториях Coulter Immunology с использованием разных проточных цитометров Coulter. На одном приборе выполнялось тридцать одно повторное измерение. Для всех измерений использовались пробы крови от одного здорового донора. Пробы окрашивались моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE T4-RD1/ T8-FITC. Результаты выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

	Средний %			Средний %		
Лаборатория/ прибор	**T4+**	**±1 SD**	**%CV**	**T8+**	**±1 SD**	**%CV**
1 (EPICS Profile)	50	1	2	18	1	5
2 (EPICS V)	50	1	2	19	1	5
3 (EPICS C)	51	1	2	19	1	5

ИЗБРАННЫЕ ССЫЛКИ

1. McMichael, AJ, ed: Leukocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens: 1987. Oxford: Oxford University Press, p 202, 206.
2. Morimoto, C, Letvin, NL, Distaso, JA, Aldrich, WR and Schlossman, SF: 1985. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. J Immunol 134: 1508-1515.
3. Morimoto, C, Letvin, NL, Distaso, JA, Brown, HM and Schlossman, SF: 1986. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. Eur J Immunol 16: 198-204.
4. Reinherz, EL, Meuer, SC and Schlossman, SF: 1983. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunol Today 4: 5-8.
5. Reinherz, EL, Morimoto, C, Fitzgerald, KA, Hussey, RE, Daley, JF and Schlossman, SF: 1982. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J Immunol 128: 463-468.
6. Meuer, SC, Schlossman, SF and Reinherz, EL: 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility regions. Proc Natl Acad Sci USA 79: 4395-4399.
7. Reinherz, EL, Hussey, RE, Fitzgerald, K, Snow, P, Terhorst, C and Schlossman, SF: 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. Nature 294: 168-170.
8. Reinherz, EL, Cooper, MD and Schlossman, SF: 1981. Abnormalities of T cell maturation and regulation in human beings with immunodeficiency disorders. J Clin Invest 68: 699-705.
9. Schmidt, RE: 1989. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. Blut 59:200-206.
10. de Martini, RM and Parker, JW: 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3: 56-70.
11. Fauci, AS: 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239: 617-622.
12. Collier, AC, Meyers, JD, Corey, L, Murphy, VL, Roberts, PL and Handsfield, HH: 1987. Cytomegalovirus infection in homosexual men. Relationship to sexual practices, antibody to human immunodeficiency virus, and cell-mediated immunity. Am J Med 82: 593-601.
13. Taylor, MGJ, Fahey, JL, Detels, R and Giorgi, JV: 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2: 114-124.
14. Morimoto, C, Hafler, DA, Weiner, HL, Letvin, NL, Hagan, M, Daley, J and Schlossman, SF: 1987. Selective loss of the suppressor-inducer T-cell subset in progressive multiple sclerosis. Analysis with anti-2H4 monoclonal antibody. N Engl J Med 316: 67-72.
15. Reinherz, EL, Weiner, HL, Hauser, SL, Cohen, JA, Distaso, JA and Schlossman, SF: 1980. Loss of suppressor T cells in active multiple sclerosis. Analysis with monoclonal antibodies. N Engl J Med 303: 125-129.
16. Weiner, JL, Hafler, DA, Fallis, RJ, Johnson, D, Ault, KA and Hauser, SL: 1984. Altered blood T-cell subsets in patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 6: 115-121.
17. Smolen, JS, Chused, TM, Leiserson, WM, Reeves, JP, Alling, DW and Steinberg, AD: 1982. Heterogeneity of immunoregulatory T cell subsets in systemic lupus erythematosus. Am J Med 727: 783-790.
18. Smolen, JS, Morimoto, C, Steinberg, AD, Wolf, A, Schlossman, SF, Steinberg, RT, Penne, E, Reinherz, EL, Rerchlin, M and Chused, TM: 1985. Systemic lupus erythematosus: delineation of subpopulations by clinical, serologic and T cell marker analysis. Am J Med Sci 289: 139-147.
19. Morimoto, C, Reinherz, EL, Schlossman, SF, Shur, PH, Mills, JA and Steinberg, SD: 1980. Alterations in immunoregulatory T cell subsets in active systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 66: 1171-1174.
20. Raziuddin, S, Nur, MA and Alwabel, AA: 1989. Selective loss of the CD4+ inducers of suppressor T cell subsets (2H4+) in active systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 16: 1315-1319.
21. Sato, K, Miyasaka, N, Yamaoka, K, Okuda, M, Yata, J and Nishioka, K: 1987. Quantitative defect of CD4+2H4+ cells in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 30: 1407-1411.
22. Ramos, EL, Turka, LA, Leggat, JE, Wood, IG, Milford, EL and Carpenter, CB: 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47: 465-471.
23. Pedrazzini, AS, Freedman, AS, Andersen, J, Heflin, L, Anderson, K, Takvorian, R, Canellos, GP, Whitman, J, Coral, F, Ritz, J and Nadler, LM: 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood 74: 2203-2211.
24. Reinherz, EL, Kung, PC, Goldstein, G and Schlossman, SF: 1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J Immunol 123: 1312-1317.
25. Reinherz, EL, Haynes, BF, Nadler, LM and Bernstein, ID, eds: Leukocyte Typing II, Human T Lymphocytes: 1986. New York: Springer-Verlag, p 8-9.
26. Koepke JA and Landay AL. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol, 1989; 52:19-27.

ДОСТУПНОСТЬ ПРОДУКТА

CYTO-STAT/COULTER CLONE T4-RD1/T8-FITC
Моноклональные антитела,
REF 6603802 - 50 тестов (0,5 mL)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

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

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Редакция LC, 07/2013

Изменения были внесены в:

- ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT/COULTER CLONE
- РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ

Редакция LD, 11/2014

Изменения были внесены в:

- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Версия LE, 06/2016

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- Обновленный адрес представительства в ЕС
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT/ COULTER CLONE T11–FITC, T11-RD1

REF 6603863 — 50 тестов
REF 6603849 — 50 тестов

Ч.№ 4235990-JE

CE BECKMAN COULTER

	T11-FITC	T11-RD1
Специфичность	CD2	CD2
Клон	SFC13Pt2H9	SFC13Pt2H9
Гибридома	NS/1–AG4 x BALB/c	NS/1–AG4 x BALB/c
Иммуноген	Клетки опухоли от пациента с Т клеточным CLL (хроническим лимфолейкозом)	Клетки опухоли от пациента с Т клеточным CLL (хроническим лимфолейкозом)
Цепь Ig	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость мыши	Асцитическая жидкость мыши
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 486—509 нм / Излучение при 504—541 нм	Возбуждение при 486—580 нм / Излучение при 568—590 нм
Конъюгация	FITC (флуоресцин изотиоцианат)	RD1 (фикоэритрин)
Молярное отношение	FITC/Белок: 5—10	RD1/Белок: 0,5—1,5

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1 или T11-FITC представляет собой реактив с флуоресцирующими моноклональными антителами мыши, предназначенный для выявления и количественного определения доли CD2+ (T11+) Т лимфоцитов в цельной крови методом проточной цитометрии.[1-3]

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов периферической крови человека состоит из клеток трех типов — Т (происходящих из тимуса), В (происходящих из костного мозга) и нулевых клеток.[4] Клетки этих типов морфологически неразличимы при обычной микроскопии, однако могут быть идентифицированы за счет характерных антигенных различий клеточных мембран.

Антиген CD2, ассоциированный с рецептором Е-розетки и имеющий молекулярную массу 50 кДа[1,2,] является ранним, специфичным ко всем линиям Т-клеток поверхностным антигеном, и обычно присутствует на некоторых протимоцитах костного мозга, на более чем 95 % тимоцитов, на всех периферических Т-лимфоцитах и на субпопуляции клеток натуральных киллеров.[1,2,5] После появления антиген CD2 экспрессируется непрерывно на всем протяжении дифференциации Т-лимфоцитов.[5] Антиген CD2 не обнаружен на В-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах или тромбоцитах.[2]

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Снижение числа Т-клеток обнаруживается у больных с рядом аутоиммунных расстройств, включая множественный склероз, системную красную волчанку и экзему.[6] Со снижением числа Т-лимфоцитов ассоциирована аплазия тимуса (синдром Ди Джорджи). Повышение количества Т-лимфоцитов отмечено у больных с острым инфекционным мононуклеозом и некоторыми формами приобретенной агаммаглобулинемии, вызванными наличием активированных супрессорных клеток.[6]

МЕТОД АНАЛИЗА

Моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1 или T11-FITC представляют собой моноклональные антитела, позволяющие определить долю Т-клеточных поверхностных антигенов в цельной крови методом проточной цитометрии. Этот тест основан на способности моноклональных антител связываться клетками, экспрессирующими отдельные антигенные детерминанты. CYTO-STAT/COULTER CLONE T11–RD1 или T11-FITC добавляют к пробе цельной крови. Соответствующий изотипический контроль (MsIgG1-RD1 или MsIgG1-FITC) добавляют ко второй пробе, взятой из того же образца. Растворы перемешивают и инкубируют. Эритроциты в окрашенном образце лизируют, оставшиеся клетки подвергают анализу методом проточной цитометрии.

РЕАГЕНТЫ

См. таблицу выше.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

T11-FITC: концентрация антител 0,56 мкг/тест.

T11-RD1: концентрация антител 0,56 мкг/тест.

Концентрация реагентов, не являющихся антителами составляет: 0,2 % BSA, 0,01 М фосфата калия, 0,15 М NaCl, 0,1 % NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com.***

1. Данный реагент содержит азид натрия. В кислой среде из азида натрия образуется азотистоводородная кислота, крайне токсичное соединение. При утилизации азидные соединения должны смываться проточной водой. Для избежания отложения материалов в металлических трубах, в результате чего может возникать угроза взрыва, рекомендуется соблюдать эту меру предосторожности. В случае контакта с глазами или кожей промыть их избыточным количеством воды.
2. Не используйте антитела после истечения срока хранения, указанного на этикетке.
3. С образцами, полученными от пациента, и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими возбудителей инфекционных заболеваний и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
4. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания материала образцов, полученных от пациента, на кожу и слизистые оболочки.
5. При хранении или инкубировании не подвергайте реагенты воздействию интенсивного освещения.
6. При использовании продолжительности или температуры инкубирования, отличающейся от указанной, результаты могут оказаться неверными.
7. Избегайте микробного загрязнения реагентов, в противном случае возможно получение ошибочных результатов.
8. Ядовит при употреблении внутрь.
9. При попадании на кожу немедленно обильно промойте участок кожи водой.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Нет. Моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE используются непосредственно из ампулы, разбавление или центрифугирование не требуется.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Этот реагент сохраняет стабильность в течение периода, указанного на этикетке, в случае хранения при температуре 2-8 °C. Избегать замораживания, не подвергать воздействию света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств реагента или любые серьезные отклонения в показаниях, полученных для контрольных испытуемых, могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагент использовать нельзя.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Пробу венозной крови необходимо получать асептически, путем пунктирования вены, она должна находиться в пробирке для сбора крови с подходящим антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА). Подробнее об особенностях сбора крови методом венепункции и интерферирующих условиях см. «Процедуры сбора образцов крови для диагностики методом венепункции (H3), одобренное издание», опубликованное Институтом клинических и лабораторных стандартов. Для каждого теста требуется 100 мкл цельной крови. От каждого пациента необходимо набрать достаточное для проведения теста, контроля и получения запаса аутологической плазмы для разбавления образца (если потребуется) количество крови.

ВНИМАНИЕ! Стабильность отклоняющихся от нормы образцов может меняться в значительных пределах. Для получения оптимальных результатов анализ следует начать в течение 6 часов после пункции вены. Неокрашенная кровь с добавленным антикоагулянтом до начала обработки должна храниться при температуре 20-25 °C.

ПРОЦЕДУРА

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1
REF 6603849 — 50 тестов (0,5 мл)

ИЛИ

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-FITC
REF 6603863 — 50 тестов (0,5 мл)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Реагент для лизирования эритроцитов

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

Разбавитель (если требуется) аутологическая плазма

ИЛИ

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

Разбавитель (если требуется) аутологическая плазма

ИЛИ

Набор реагентов для лизирования цельной крови, Ч.№ 6603152 — 300 тестов, Ч.№ 6602794 — 100 тестов

Изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG1-RD1 Ч.№ 6604112 — 50 тестов (0,5 мл)

ИЛИ

Изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG1-FITC Ч.№ 6603864 — 50 тестов (0,5 мл)

Пробирки 12 x 75 мм

Силиконизирующее средство для стеклянной посуды

Пробирки для сбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Микропипетки

Проточный цитометр (см. раздел «Требования к инструментам»)

ТРЕБОВАНИЯ К ИНСТРУМЕНТАМ

Проточный цитометр, обеспечивающий возбуждение и измерение излучения рассеивания и флуоресценции, как указано в таблице на странице 1 для конкретного продукта. При настройке компенсации ФЭУ напряжения и флуоресценции перед анализом пользователи должны обратиться к инструкциям из руководства пользователя от производителя инструмента.

1. Прогон изотипического контроля должен выполняться с каждым образцом пациента. Промаркируйте пробирки, используемые для каждого теста и контроля. Добавьте 100 мкл образца венозной крови в каждую пробирку. Соблюдайте осторожность, чтобы не загрязнить кровью верх и боковые стороны пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Цельная кровь, содержащая более 10 000 клеток/мкл, может нуждаться в разбавлении до достижения уровня содержания 3000-10 000 клеток/мкл. При использовании системы реагентов COULTER IMMUNOPREP рекомендуемым разбавителем является аутологичная плазма. При использовании реагентов для лизирования цельной крови в качестве предпочтительного разбавителя нужно использовать физиологический раствор с фосфатным буфером.

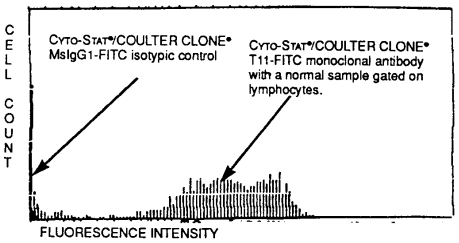
2. Добавьте по 10 мкл необходимых реагента CYTO-STAT/COULTER CLONE и изотипического контроля CYTO-STAT/COULTER CLONE в соответствующим образом промаркированные пробирки (этап 1) для каждого исследуемого образца пациента.
3. Перемешать и инкубировать не менее 10 минут при 20-25 °C.

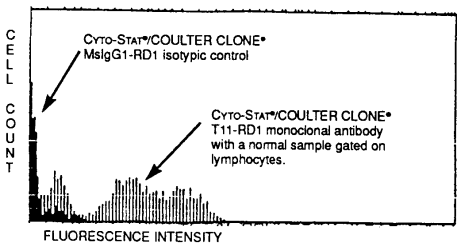
ВАЖНО! Если возле горловины пробирки остались капли крови, их следует удалить, в противном случае нелизированные эритроциты могут загрязнить готовый образец и стать причиной искажения результатов. Для удаления капель можно использовать ватную палочку.

4. Выполните лизис клеток в каждой пробирке, используя рекомендованную Coulter методику. (См. руководство по продуктам Q-PREP, MULTI-Q-PREP или TQ-Prep.)
5. Выполните анализ на проточном цитометре.
   a. Значения флуоресценции проточной цитометрии необходимо регистрировать на логарифмической шкале.
   b. Свет, рассеиваемый по переднему углу (FALS) можно регистрировать на линейной шкале. Рассеяние 90°LS можно регистрировать на линейной или логарифмической шкале.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ МЕТОДИКИ РЕГИСТРАЦИИ ПРИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ

1. Зарегистрируйте гистограмму 90° LS от FALS. Могут быть выявлены три составляющих.
2. Для популяции лимфоцитов зарегистрируйте логарифмическую интегрированную флуоресценцию (LIGFL или LIRFL) с селектором на 90° LS и FALS. Долю положительных клеток можно определить интегрированием пика чистой флуоресценции. (Подробные сведения см. в Руководстве по использованию проточного цитометра.)





АБСОЛЮТНЫЙ ПОДСЧЕТ

Чтобы выполнить абсолютный подсчет, используйте следующую формулу.

Абсолютное количество [клеток/мм^3 (или клеток/мкл)] = Общее количество лейкоцитов [клеток/мм^3 (или клеток/мкл)] x % лимфоцитов x % положительно окрашенных клеток/10^4

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Чтобы удостовериться в соблюдении надлежащих рабочих условий, в качестве контроля следует выполнить прогон на материале, полученном от обычного, практически здорового донора. Границы нормы должны быть установлены в пределах местной популяции обычных доноров.

Специфическое и/или неспецифическое Fc связывание антител с моноцитами и гранулоцитами, имеющимися в образце, можно исключить путем надлежащей селекции лимфоцитов в проточном цитометре.

Для исключения влияния неспецифического Fc связывания антител с лимфоцитами для каждого образца используется соответствующий изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE. Популяция ярко флуоресцирующих положительно окрашенных лимфоцитов измеряется с селектором, установленным для исключения низкоуровневой неспецифической флуоресценции.

Неспецифическая флуоресценция (если квадранты установлены таким образом, чтобы отсекать 98±1 % неспецифического окрашивания) у здоровых лиц обычно не превышает 1-2 %. Если фоновый уровень выше курсора в любом из контрольных образцов больше 1-2 %, результаты теста могут быть ошибочны.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При длительном хранении или охлаждении образцов крови результаты могут оказаться неверными. У пациентов с иммунодефицитами могут возникать особые проблемы ввиду измененного или очень низкого числа клеток некоторых клеточных популяций лимфоцитов.
2. Данные реагенты не подлежат разбавлению, разделению на порции или заморозке, они должны использоваться в исходной упаковке.
3. Эти реагенты предназначены исключительно для проточной цитометрии.
4. Эти реагенты предназначены для использования только с препаратами цельной крови.
5. Образцы должны подвергнуться лизису в течение 6 часов после их получения. До окрашивания и лизирования пробы должны оставаться в пробирках, в которых собирали кровь, их следует хранить при температуре 20-25 °C.
6. Не все эритроциты могут лизироваться при следующих условиях: ядросодержащие эритроциты, патологическая концентрация белка или гемоглобинопатии.
7. Реагенты CYTO-STAT/COULTER CLONE поставляются в избыточном количестве, обеспечивающем достаточный объем материала для выполнения 50 тестов из ампулы. Однако часть этого объема может теряться при каждом извлечении жидкости из ампулы пипеткой. Чем чаще выполняется взятие реагента пипеткой, тем больший объем будет теряться.
8. Патологические состояния не всегда сопровождаются патологическими изменениями процентного содержания Т- и В-лимфоцитов. Например, у лиц с патологическими изменениями доли Т- и В-лимфоцитов могут оставаться такими же, как у здоровых людей. Результаты теста должны использоваться вместе с результатами клинической оценки и другими диагностическими процедурами.
9. Из-за неприемлемого разброса результатов применения разных лабораторных методов для подсчета абсолютного числа клеток необходимо проводить проверку точности используемого метода[7].

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Образцы крови были получены от популяции практически здоровых мужчин и женщин. В эту популяцию входили взрослые люди в возрасте от 19 до 65 лет разных рас, а также дети. Ожидаемые значения для цельной крови находятся в пределах 60-72 % T11+ от общей популяции лимфоцитов, анализированной методом проточной цитометрии. Значения представлены исключительно в качестве пояснений. Каждая лаборатория обязана установить свой уровень ожидаемых значений, используя местную популяцию здоровых доноров.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD2 является ранним, специфичным ко всем линиям Т-клеток поверхностным антигеном, и обычно присутствует на некоторых протимоцитах костного мозга, на более чем 95 % тимоцитов, на всех периферических Т-лимфоцитах и на субпопуляции клеток натуральных киллеров.[1,2,5] После появления антиген CD2 экспрессируется непрерывно на всем протяжении дифференциации Т-лимфоцитов.[5] Антиген CD2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

не обнаружен на В-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах или тромбоцитах.[2]

Одним из критериев выпуска готового продукта каждой серии моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1 и T11-FITC является ее скрининг на В-клеточной линии (В-клетки лимфомы Беркитта) для исключения любой перекрестной реактивности с человеческими В-лимфоцитами. Эта клеточная линия характеризуется 85-100 % реактивностью с моноклональными антителами COULTER CLONE B1 (специфичными для В-клеток) и отсутствием реакции с моноклональными антителами CYTO-STAT/ COULTER CLONE T11-RD1 и T11-FITC.

Описание выполнения контроля неспецифического окрашивания моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1 и T11-FITC см. в разделе «Процедура контроля качества ».

ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

Методом проточной цитометрии (проточный цитометр COULTER EPICS XL-MCL с селектором лимфоцитов) изучали степень согласованности результатов определения CD2+ клеток в лизированных образцах цельной крови в норме и при патологических состояниях при помощи реагентов моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-FITC и T11-RD1 и препаратов сравнения Immunotech CD2-FITC и Immunotech CD2-PE. Полученные данные представлены в следующей таблице и рисунках, они свидетельствуют, что указанные реагенты являются эквивалентными по реактивности в отношении зрелых Т-лимфоцитов периферической крови.

Значения выражены в процентах (%) от общего количества лимфоцитов. Все значения скорректированы с учетом чистоты селектора лимфоцитов (пределы селектора лимфоцитов: извлечение ≥ 90 % и чистота ≥ 85 %).

	% T11+ лимфоциты			
Реагент	**n**	**Мин.**	**Макс.**	**Среднее, ±1 SD (Стандартное отклонение)**
CS/CC T11-FITC	31	1,37	96,9	78,6 ±19,98
IOT CD2-FITC	31	2,09	97,8	78,6 ±19,97
CS/CC T11-RD1	31	2,02	99,3	79,3 ±20,30
IOT CD2-PE	31	1,6	99,3	79,5 ±20,50

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В ходе прогона (внутрилабораторная)

С использованием проточного цитометра COULTER EPICS XL-MCL были выполнены десять повторных измерений на каждом из трех уровней концентрации T11+ лимфоцитов. Для формирования этих разных уровней был выполнен скрининг и отбор образцов нормальной цельной крови. Клетки окрашивали реагентам моноклональных антител CYTO-STAT/ COULTER CLONE T11-FITC и CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1. Значения выражены в процентах (%) от общего количества лимфоцитов.

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-FITC

Уровень	**n**	**Среднее значение % T11+**	**±1 SD (Стандартное отклонение)**	**%CV (Коэффициент вариации)**
1	10	21,2	0,52	2,4
2	10	78,6	0,62	0,8
3	10	88,1	0,61	0,7

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1

Уровень	**n**	**Среднее значение % T11+**	**±1 SD (Стандартное отклонение)**	**%CV (Коэффициент вариации)**
1	10	21,3	0,62	2,9
2	10	78,2	0,39	0,5
3	10	88,5	0,40	0,4

Межлабораторная

В один и тот же день в трех разных лабораториях Coulter Corporation выполнено исследование с применением трех разных проточных цитометров. На каждом инструменте выполнено десять повторных измерений. Для всех измерений использован один образец крови от одного нормального донора-человека. Образец крови разделили на три части, каждая лаборатория выполняла окраску образца реагентами моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-FITC и CYTO-STAT/ COULTER CLONE T11–RD1. Значения выражены в процентах от общего количества лимфоцитов. Значения представлены для отдельных видов и комбинированной воспроизводимости.

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-FITC

Лаборатория/ инструмент	**n**	**Среднее значение % T11+**	**±1 SD (Стандартное отклонение)**	**%CV (Коэффициент вариации)**
1 XL-MCL	10	76,9	0,64	0,8
2 XL-MCL	10	76,7	0,64	0,8
3 XL-MCL	10	78,2	0,81	1,0
Комбинация	30	77,3	0,96	1,2

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1

Лаборатория/ инструмент	**n**	**Среднее значение % T11+**	**±1 SD (Стандартное отклонение)**	**%CV (Коэффициент вариации)**
1 XL-MCL	10	76,3	0,52	0,7
2 XL-MCL	10	76,3	0,72	0,9
3 XL-MCL	10	76,7	0,61	0,8
Комбинация	30	76,5	0,63	0,8

ССЫЛКИ

1. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, and Schlossman SF eds: 1984. Leukocyte Typing, New York: Springer-Verlag. p. 26, 28, 41-42, 196, 201, 215-216.
2. McMichael AJ, ed: 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press. p. 38-40, 42, 106-107, 116, 199, 302-306, 308, 315, 475.
3. Reinherz, EL, Haynes, BF, Nadler, LM and Bernstein, ID: 1986, Leukocyte Typing II, New York: Springer-Verlag, Vol. 1. p. 6, 16, 364-365.
4. Reinherz EL and Schlossman SF: 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19: 821-827.
5. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF and Schlossman SF: 1983. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. J Immunol 131: 244-250.
6. Reinherz, E.L. and Schlossman, S.F.: 1981. The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets. Immunol Today 2: 69-75.
7. Koepke JA and Landay AL: 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52: 19-27.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-RD1
REF 6603849 - 50 тестов (0,5 мл)
CYTO-STAT/COULTER CLONE T11-FITC
REF 6603863 - 50 тестов (0,5 мл)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с локальным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

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

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

Версия Статус

Версия JC, 02/2013

Изменения были внесены в:

- Добавлены новые языки

Версия JD, 11/2014

Изменения были внесены в:

- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Версия JE, 09/2016

Изменения были внесены в:

- Обновленный адрес представительства в ЕС

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT/ COULTER CLONE Mo2-FITC, Mo2-RD1

REF 6604114 — 50 тестов
REF 6604500 — 50 тестов

Ч.№ 4236037-KE

	Mo2-FITC	Mo2-RD1
Специфичность	CD14	CD14
Клон	116	116
Гибридома	P3/NS1/1-AG4-1 x BALB/c	P3/NS1/1-AG4-1 x BALB/c
Иммуноген	Осажденные мононуклеарные клетки периферической крови человека	Осажденные мононуклеарные клетки периферической крови человека
Цепь Ig	IgM	IgM
Вид	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость или кондиционированная среда	Асцитическая жидкость или кондиционированная среда
Очистка	Гель-фильтрационная хроматография	Гель-фильтрационная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 486—509 нм / Излучение при 504—541 нм	Возбуждение при 486—580 нм / Излучение при 568—590 нм
Конъюгация	FITC (флуоресцин изотиоцианат)	RD1 (фикоэритрин)
Молярное отношение	FITC/белок: 20—30	RD1/белок: 0,5—1,5
Определение рассеяния	Переднее и/или боковое	Переднее и/или боковое

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или Mo2-FITC (CD14) представляет собой реактив с флуоресцирующими моноклональными антителами мыши, предназначенный для выявления и количественного определения доли Mo2+ моноцитов в цельной крови методом проточной цитометрии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Mo2, мышиное моноклональное антитело, член гетерогенного кластера моноклональных антител, распознающих наиболее зрелые моноциты.[1,2] Сообщается, что молекулярная масса антигена, распознаваемого антителом Mo2, составляет 55 кДа.[1,3] Хотя способность реагировать с тем же гликопротеином 55 кДа обнаруживает сходное моноклональное антитело MY4 (CD14), Mo2 и MY4 проявляют специфичность к разным эпитопам.[2]

Было показано, что антитела Mo2 реагируют примерно с 58—84 % моноцитами периферической крови.[4,5] Антитела Mo2 реагируют с антигеном миелоидной дифференцировки, этот антиген не обнаруживается на клетках-предшественниках миелоидного ряда, включая промиелоциты, он представляется характерным признаком поздней стадии дифференцировки линии миелоидная клетка — моноцит — макрофаг (моноцит).[5,6]

МЕТОД АНАЛИЗА

Этот тест основан на способности моноклональных антител связываться с поверхностью клеток, экспрессирующих отдельные антигенные детерминанты. CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или Mo2-FITC представляют собой мышиные моноклональные антитела, специфичные к клеточному поверхностному антигену. Специфическое окрашивание клеток осуществляется путем инкубации цельной крови с реагентом CYTO-STAT/COULTER CLONE. Эритроциты лизируются, а оставшиеся лейкоциты подвергаются анализу методом проточной цитометрии с использованием селектора моноцитов. В каждой пробе определяют долю положительно окрашенных моноцитов. Для оценки неспецифической фоновой флуоресценции используется дублирование пробы цельной крови с окраской изотипичным контрольным реагентом CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-RD1 или MsIgM-FITC. (Этикетка на реагенте изотипичного контроля должна соответствовать этикетке на реагенте моноклональном антителе.)

РЕАГЕНТЫ

См. таблицу выше.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Mo2-FITC: концентрация антител 0,55 мкг/тест.
Mo2-RD1: концентрация антител 1,1 мкг/тест.

Окончательная концентрация реагентов, не являющихся антителами в 0,5 мл (1 ампула) составляет: 0,2 % BSA, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1 % NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com***.

1. Данный реагент содержит азид натрия. В кислой среде из азида натрия образуется азотистоводородная кислота, крайне токсичное соединение. При утилизации азидные соединения должны смываться проточной водой. Для избежания отложения материалов в металлических трубах, в результате чего может возникать угроза взрыва, рекомендуется соблюдать эту меру предосторожности. В случае контакта с глазами или кожей промыть их избыточным количеством воды.
2. Не используйте антитела после истечения срока хранения, указанного на этикетке.
3. С пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими возбудителей инфекционных заболеваний и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
4. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания материала проб на кожу и слизистые оболочки.
5. При хранении или инкубировании не подвергайте реагенты воздействию интенсивного освещения.
6. При использовании продолжительности или температуры инкубирования или центрифугирования, отличающейся от указанной, результаты могут оказаться неверными.
7. Избегайте микробного загрязнения реагентов, в противном случае возможно получение ошибочных результатов.
8. Ядовит при употреблении внутрь.
9. При попадании на кожу немедленно обильно промойте участок кожи водой.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Нет. Моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE используются непосредственно из ампулы, разбавление или центрифугирование не требуется.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Этот реагент сохраняет стабильность в течение периода, указанного на этикетке, в случае хранения при температуре 2—8 °C. Избегать замораживания, не подвергать воздействию света. Перед использованием все реагенты должны быть подогреты до температуры 20—25 °C.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств реагентов* или любые серьезные отклонения в показаниях, полученных для контрольных проб, могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагенты использовать нельзя.

***Обычный вид реагентов**

С маркировкой RD1:	прозрачная бесцветная или розоватая жидкость
С маркировкой FITC:	прозрачная бесцветная или желтоватая жидкость

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! Стабильность проб крови может меняться в значительных пределах. Для получения оптимальных результатов анализ следует начать в течение 6 часов после пункции вены. Неокрашенная кровь с добавленным антикоагулянтом до начала обработки должна храниться при температуре 20—25 °C. Не охлаждать.

Пробу венозной крови необходимо получать асептически, путем пунктирования вены, она должна находиться в пробирке для сбора крови с подходящим антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА). Подробнее об особенностях сбора крови методом венепункции и интерферирующих условиях см. «Процедуры сбора образцов крови для диагностики методом венепункции (H3), одобренное издание», опубликованное Институтом клинических и лабораторных стандартов. Для каждого теста требуется 100 мкл цельной крови. Необходимо набрать достаточное для проведения теста, контроля и получения запаса аутологической плазмы для разбавления образца (если потребуется) количество крови (от 1 до 2 мл на пробирку). Необходимо произвести подсчет количества лейкоцитов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МЕТОДИКА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ CYTO-STAT/COULTER CLONE

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Моноклональные антитела
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1
REF 6604500 — 50 тестов (0,5 мл)

ИЛИ

Моноклональные антитела
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC
REF 6604114 — 50 тестов (0,5 мл)

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Реагент для лизирования эритроцитов

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

Разбавитель (если требуется) аутологическая плазма

ИЛИ

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

Разбавитель (если требуется) аутологическая плазма

ИЛИ

Набор реагентов для лизирования цельной крови, Ч.№ 6602764 — 100 тестов, Ч.№ 6603152 — 300 тестов

Разбавитель (если требуется) Физиологический раствор с фосфатным буфером (pH 7,2), Ч.№ 6603369

Изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-RD1, Ч.№ 6604117 — 50 тестов (0,5 мл)

ИЛИ

Изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-FITC, Ч.№ 6603877 — 50 тестов (0,5 мл)

Силиконизирующее средство для стеклянной посуды

Пробирки 12 x 75 мм

Пробирки для сбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Переносящие пипетки

Вращательная мешалка

Проточный цитометр (см. раздел «Требования к инструментам»)

Счетчик клеток или гемоцитометр

Микропипетки

ТРЕБОВАНИЯ К ИНСТРУМЕНТАМ

Проточный цитометр, обеспечивающий возбуждение и измерение излучения рассеивания и флуоресценции, как указано в таблице на странице 1 для конкретного продукта. При настройке компенсации ФЭУ напряжения и флуоресценции перед анализом, пользователи должны обратиться к инструкциям из руководства пользователя от производителя инструмента.

ПРОЦЕДУРА

1. Оптимальное окрашивание достигается при количестве лейкоцитов в пределах 3—10 x 10^3 клеток/мкл. Если количество лейкоцитов превосходит уровень 10 x 10^3 клеток/мкл, образец необходимо разбавить, а если количеств лейкоцитов меньше 3 x 10^3 клеток/мкл, необходимо выполнить центрифугирование с последующим повторным получением суспензии, итоговое количество лейкоцитов должно входить в диапазон 3—10 x 10^3 клеток/мкл. При использовании системы реагентов COULTER IMMUNOPREP рекомендуемым разбавителем является аутологичная плазма. При использовании набора реагентов для лизирования цельной крови в качестве предпочтительного разбавителя нужно использовать физиологический раствор с фосфатным буфером (pH 7,2, Ч.№ 6603369).
2. С каждой пробой следует выполнять прогон соответствующего изотипического контроля (в данном случае, CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-RD1 или MsIgM-FITC). Для каждой пробы необходимо пометить две пробирки 12 x 75 мм, одну для моноклональных антител, другую для изотипического контроля. Добавьте 100 мкл образца венозной крови в каждую пробирку. Соблюдайте осторожность, чтобы избежать попадания крови на верхнюю и боковые части пробирок; в противном случае лизис может быть неполным.
3. Добавьте 10 мкл реагента CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или Mo2-FITC или изотипического контроля CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-RD1 или MsIgM-FITC в промаркированные пробирки.
4. Осторожно смешайте. Если используется система реагентов COULTER IMMUNOPREP, инкубируйте реакционную смесь при 20—25 °C в течении 10—12 минут. Если используется набор реагентов для лизирования цельной крови, инкубируйте реакционную смесь при 20—25 °C в течении 45—47 минут.

ВАЖНО! Если возле горловины пробирки остались капли крови, их следует удалить, в противном случае нелизированные эритроциты могут загрязнить готовый образец и стать причиной искажения результатов. Для удаления капель можно использовать ватную палочку.

5. Выполните лизирование эритроцитов в каждой пробирке, руководствуясь методикой, рекомендуемой для выбранного метода лизирования (система реагентов COULTER IMMUNOPREP для рабочих станций COULTER Q-PREP, MULTI-Q-PREP, TQ-Prep или набор реагентов для лизирования цельной крови).

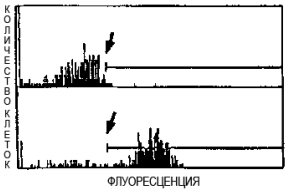
АНАЛИЗ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

ВНИМАНИЕ! Если лазер проточного цитометра смещен или если селекторы были установлены неправильно, результаты могут оказаться ошибочными.

1. Выполняйте анализ клеток на надлежащем образом стандартизированном проточном цитометре, с настройкой селектора моноцитов согласно руководства по эксплуатации инструмента. Для обеспечения максимальной жизнеспособности выполняйте анализ окрашенных клеток своевременно.
2. На следующих гистограммах показаны примеры нормальных образцов, исследованных на проточном цитометре COULTER EPICS XL/XL-MCL с селектором моноцитов. Курсор (↑) установлен таким образом, чтобы, используя изотипический контроль, отсечь 98±1 % результатов неспецифического окрашивания. Флуоресценция слева от курсора является результатом неспецифического окрашивания, а справа — расценивается как результат специфического окрашивания.
3. Описание того, как изотипический контроль используется при анализе результатов проточной цитометрии, см. в разделе «Процедура контроля качества ».

Прямое окрашивание поверхности клеток





АБСОЛЮТНЫЙ ПОДСЧЕТ

Чтобы выполнить абсолютный подсчет, используйте следующую формулу.

Абсолютные значения = Общее количество лейкоцитов (клеток/мкл) x % моноцитов x % положительно-окрашенных клеток/10^4

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Чтобы удостовериться в соблюдении надлежащих рабочих условий, в качестве положительного контроля следует выполнить прогон на материале, полученном от обычного, практически здорового донора. Границы нормы должны быть установлены в пределах местной популяции обычных доноров.

Неспецифическое Fc связывание антител с гранулоцитами, имеющимися в образце, можно исключить путем надлежащей селекции моноцитов в проточном цитометре.

Для исключения влияния неспецифического Fc связывания антител с моноцитами, для каждого образца используется соответствующий изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE. Популяция ярко флуоресцирующих положительно окрашенных моноцитов измеряется с селектором, установленным для исключения низкоуровневой неспецифической флуоресценции.

Неспецифическая флуоресценция выше курсора фонового уровня (если курсор установлен таким образом, чтобы отсекать 98±1 % неспецифического окрашивания) у здоровых лиц обычно не превышает 1—2 %. Если фоновый уровень выше курсора в любом из контрольных образцов больше 1—2 %, результаты теста могут быть ошибочны.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для получения оптимального результата пробы крови должны быть окрашены в течение 6 часов от момента их получения. До окрашивания и анализа пробы должны оставаться в пробирках, в которых собирали кровь, их следует хранить при комнатной температуре. Не охлаждать. При длительном хранении или охлаждении образцов результаты могут оказаться неверными. Для обеспечения максимальной жизнеспособности выполняйте анализ окрашенных клеток своевременно.
2. С некоторыми пациентами могут возникать особые проблемы ввиду измененного или очень низкого числа клеток некоторых клеточных популяций.
3. Данные реагенты не подлежат разбавлению, разделению на порции или заморозке. Используйте реагенты только в состоянии исходной упаковки.
4. Эти реагенты предназначены исключительно для проточной цитометрии.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Эти реагенты предназначены для использования с препаратами цельной крови. Не рекомендуется использовать их со свежими или замороженными препаратами мононуклеарных клеток.
6. Патологические состояния не всегда сопровождаются патологическими изменениями процентного содержания популяций лейкоцитов. У больного человека процентное соотношение лейкоцитов может быть такими же, как и у здорового. Используйте результаты анализа с учетом клинических и других диагностических данных.
7. Не все эритроциты могут лизироваться при следующих условиях: ядросодержащие эритроциты, патологическая концентрация белка или гемоглобинопатии. Это может стать причиной получения ошибочно заниженных результатов, поскольку не подвергшиеся лизису эритроциты будут подсчитаны как лейкоциты.
8. Избыточно длительное воздействие литических реагентов на клетки может привести к разрушению лейкоцитов.
9. Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, могут быть ошибочными, если лазер неверно отъюстирован или неправильно установлены селекторы.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Образцы крови были получены от популяции практически здоровых мужчин и женщин. В эту популяцию входили взрослые люди в возрасте от 19 до 65 лет разных рас. Образцы окрашивали моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC. Нормальные значения содержания Mo2+ клеток в цельной крови, определенные методом проточной цитометрии (проточным цитометром COULTER EPICS Profile или XL-MCL), представлены в следующей таблице. Количество лейкоцитов определяли с помощью инструмента COULTER S-Plus IV или STKS. Значения выражены в % от общей популяции (лимфоциты плюс моноциты плюс гранулоциты) и в абсолютных числах (10^3 клеток/мкл). Значения представлены исключительно в качестве пояснений. Каждая лаборатория обязана установить свой уровень ожидаемых значений, используя местную популяцию здоровых доноров.

Цельная кровь

	n	Мин.	Макс.	Среднее, ±1 SD (Стандартное отклонение)
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1				
%Mo2+ клеток	50	4	11	6 ±2
абсолютное количество Mo2+ клеток	50	208	755	429 ±126
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC				
%Mo2+ клеток	17	4	14	8 ±3
абсолютное количество Mo2+ клеток	17	276	770	448 ±136

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Было показано, что с антителами Mo2 реагирует 58—84 % моноцитов периферической крови.[4,5] Антиген Mo2 экспрессируют 6—16 % нормальных клеток костного мозга, зрелые моноциты и некоторые макрофаги, включая перитонеальные макрофаги и макрофаги, происходящие в культуре от моноцитов.[1] Он не образуется в культурах клеток клеточной линии HL-60, но экспрессируется промиелоцитарными клетками HL-60, индуцированными для дифференцировки в макрофаги.[1,4] Антиген Mo2 не экспрессируют Т и В лимфоциты, нулевые клетки и гранулоциты.[4]

Описание выполнения контроля неспецифического окрашивания моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 и CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC см. в разделе «Процедура контроля качества».

КОРРЕЛЯЦИЯ

Лизированная цельная кровь нормальных доноров была испытана методом проточной цитометрии с использованием CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1, CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC, COULTER CLONE Mo2-RD1 и COULTER CLONE Mo2-FITC. Полученные данные представлены в следующей таблице, они свидетельствуют, что указанные реагенты являются эквивалентными по реактивности в отношении моноцитов периферической крови. Значения выражены в % от общей популяции (лимфоциты плюс моноциты плюс гранулоциты).

Цельная кровь

		Среднее значение %		
Реагент	n	Mo2+	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1	50	6	2	30
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC	17	8	3	37
COULTER CLONE Mo2-RD1	16	9	1	11
COULTER CLONE Mo2-FITC	32	7	2	28

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В течение дня

В один и тот же день с использованием проточного цитометра COULTER EPICS XL-MCL было выполнено тридцать одно повторное измерение на каждом из трех уровней концентраций моноцитов. Из материала одного нормального донора были селективно удалены моноциты, положительно реагирующие с антителами Mo2. Затем клетки были разбавлены нормальным донорским материалом для получения различных концентраций. Клетки окрашивали моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC. Значения выражены в % от общей популяции (лимфоциты плюс моноциты плюс гранулоциты).

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1

Уровень	Mo2+ Среднее %	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
1	4	0,1	4
2	3	0,1	5
3	2	0,1	5

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC

Уровень	Mo2+ Среднее %	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
1	4	0,1	4
2	3	0,1	6
3	2	0,1	9

Межлабораторная

Исследования были выполнены в один и тот же день разными лабораториями Beckman Coulter с использованием разных проточных цитометров Beckman Coulter. На каждом инструменте выполнено тридцать одно повторное измерение. Для всех измерений использованы пробы крови от одного нормального донора-человека. Образцы окрашивали моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC. Значения выражены в % от общей популяции (лимфоциты плюс моноциты плюс гранулоциты).

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1

Лаборатория/инструмент	Mo2+ Среднее %	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
1 XL-MCL	5	0,1	3
2 XL-MCL	6	0,1	2
3 FC 500	4	0,2	5

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC

Лаборатория/инструмент	Mo2+ Среднее %	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
1 XL-MCL	8	0,2	2
2 XL-MCL	9	0,4	4
3 FC 500	8	0,2	2

ССЫЛКИ

1. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, and Schlossman SF, eds.: 1984. Leukocyte Typing: Berlin: Springer-Verlag, p. 108, 425-426, 428.
2. McMichael AJ, ed.: 1987. Leukocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens. Oxford: Oxford University Press, p. 586-589, Appendix E.
3. Todd RF, van Agthoven A, Schlossman SF, and Terhorst C.: 1982. Structural analysis of differentiation antigens Mo1 and Mo2 on human monocytes. Hybridoma 1:329-337.
4. Todd RF, Nadler LM, and Schlossman SF: 1981. Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies. J. Immunol. 126:1435-1442.
5. Todd RF, and Schlossman SF: 1982. Analysis of antigenic determinants on human monocytes and macrophages. Blood 59:775-786.
6. Todd RF, Griffin JD, Ritz BJ, Nadler LM, Abrams T, and Schlossman SF:1981. Expression of normal monocyte-macrophage differentiation antigens on HL60 promyelocytes undergoing differentiation induced by leukocyte conditioned-medium or phorbol diester. Leukemia Res. 5:491-495.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1
REF 6604500 — 50 тестов (0,5 мл)

Моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC
REF 6604114 — 50 тестов (0,5 мл)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с локальным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

По вопросам качества продукции обращаться к
представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

Версия Статус

Версия KC, 02/2013

Изменения были внесены в:

- Добавлены новые языки.

Версия KD, 12/2014

Изменения были внесены в:

- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Версия KE, 09/2016

Изменения были внесены в:

- Обновленный адрес представительства в ЕС

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Комплект контрольных клеток COULTER CYTO-TROL

Инструкции по применению

REF **6604248 - 50 тестов**

Ч.№ 4236083-ZF

CE BECKMAN COULTER

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект контрольных клеток COULTER CYTO-TROL используется для оценки активности моноклональных антител при проточной цитометрии.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Контрольные клетки CYTO-TROL представляют собой лиофилизированный препарат, приготовленный из человеческих лимфоцитов, на которых имеются поверхностные антигены, определяемые моноклональными антителами. Данные клетки выделены из периферической крови; на них экспрессированы антигены, соответствующие антигенам нормальных лимфоцитов. Контрольные клетки CYTO-TROL совместимы с непосредственно конъюгированными (FITC, RD1, ECD, PC5) моноклональными антителами COULTER, перечисленными в таблице ожидаемых значений и диапазонов анализа, приведенной ниже.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние значения анализа для каждого моноклонального антитела COULTER получены по результатам анализов контрольных клеток CYTO-TROL, которые трижды выполнялись на откалиброванных проточных цитометрах с настроенными параметрами и при специфических лабораторных условиях. Значения, получаемые в вашей лаборатории, могут варьировать в зависимости от условий работы в лаборатории. Абсолютное измерение характеристик следует выполнять с использованием Межлабораторной программы обеспечения качества (IQAP) компании Coulter, сравнивая результаты группового анализа среднего значения партии и CV с аналогичными результатами конкретного прибора. Процентные значения положительных популяций определялись при установке курсора на значение 98% (номинал) для неспецифического окрашивания с использованием изотипических контрольных клеток.

В данном случае при анализе проб крови с этими антителами регулировка положения курсора для разделения положительных и отрицательных популяций не выполнялась.

Показания: не применимо.

Противопоказания: не применимо.

Побочные эффекты: не применимо.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: ПОТЕНЦИАЛЬНО БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЙ МАТЕРИАЛ. Все образцы донорского человеческого материала, использованные при приготовлении данного материала, тестированы способом, утвержденным FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США), на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), и вирусам гепатита С (HCV), а также поверхностного антигена вируса гепатита В. При тестировании получены отрицательные результаты (при повторных исследованиях не получено реактивности).

1. Поскольку ни один метод тестирования не дает полной гарантии отсутствия вируса гепатита В, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), или других инфекционных агентов, с образцом/реагентом следует обращаться, соблюдая уровень биологической безопасности 2, в соответствии с рекомендацией для любых потенциально инфекционных образцов человеческой сыворотки или крови (the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,” 1988).
2. Данные реагенты содержат азид натрия. Азид натрия в кислой среде образует азотисто-водородную кислоту, которая является крайне токсичным соединением. Азидные соединения необходимо промывать проточной водой до тех пор, пока они не будут удалены. Эти меры предосторожности рекомендуется выполнять во избежание отложения на металлических трубах азидных соединений, являющихся взрывоопасными. При попадании на кожу или в глаза обильно промойте водой.
3. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
4. Контрольные клетки CYTO-TROL нельзя использовать в качестве калибратора.
5. Эти реагенты предназначены только для проточной цитометрии.
6. При проточной цитометрии возможно получение ошибочных результатов, если лазер не выровнен, или некорректно настроены селекторы.
7. Не замораживайте реагенты.
8. Избегайте микробной контаминации реагентов, в противном случае возможно получение ошибочных результатов.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке комплекта. Невскрытые реагенты стабильны до истечения срока годности при хранении при температуре 2-8°C. Восстановленные клетки CYTO-TROL стабильны до 24 часов при хранении при температуре 2-8°C. Не замораживайте. Перед использованием доведите температуру реагентов до 20-25°C.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Если контрольные клетки CYTO-TROL находятся вне ожидаемых диапазонов (таблица ожидаемых значений и диапазонов анализа), или отмечается снижение или сдвиг рассеяния света:

1. Проверьте процедуру работы прибора.
2. Проверьте технику оператора.
3. Выполните анализ невскрытого флакона контрольных клеток CYTO-TROL в соответствии с указаниями на вкладыше в упаковке.
4. Проверьте наличие признаков разрушения реагентов (помутнение или агглютинация).

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Не восстанавливайте контрольные клетки CYTO-TROL раньше, чем будете готовы использовать их.

1. Восстановите, пипетируя во флакон с клетками 1 mL восстановительного буфера.
2. Перемешайте, аккуратно переворачивая.
3. Перед использованием выдержите клетки 10 минут для стабилизации.

ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ КОНТРОЛЬНЫХ КЛЕТОК CYTO-TROL РЕАГЕНТАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА COULTER

- Рекомендуемый объем на один тест составляет 100 µL восстановленных контрольных клеток CYTO-TROL.
- Для мониторинга уровня неспецифического окрашивания рекомендуется использовать соответствующие изотипические контрольные клетки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Контрольные клетки CYTO-TROL не тестировались для использования в процедурах лизиса цельной крови. Использование для лизиса клеток красной крови систем реагентов COULTER Q-PREP/IMMUNOPREP, MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP или TQ-Prep/IMMUNOPREP может вызвать отклонение от заданных значений.

Процедура окрашивания для моноклональных антител не CYTO-STAT:

1. Замените 100 µL интересующей пробы восстановленными контрольными клетками CYTO-TROL и выполните процедуру иммунофлуоресцентного окрашивания клеточной поверхности, используя соответствующие моноклональные антитела не CYTO-STAT.
2. Выполните анализ пробы на проточном цитометре.

Процедура окрашивания для моноклональных антител CYTO-STAT:

1. Добавьте 10 µL моноклональных антител к 100 µL восстановленных контрольных клеток CYTO-TROL. Осторожно перемешайте.
2. Инкубируйте при комнатной температуре минимум 15 минут.
3. После инкубации добавьте в каждую пробирку 1 mL физиологического раствора с фосфатным буфером (pH=7,2), Ч.№ 6603369. Осторожно перемешайте.
4. Выполните анализ пробы на проточном цитометре.

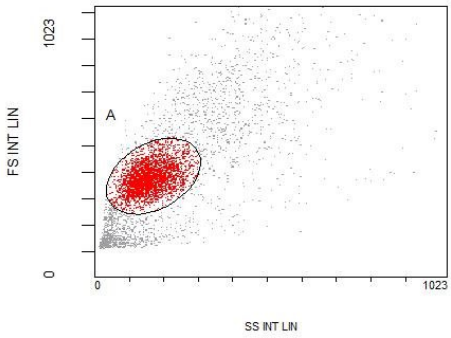
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для значения рассеяния света и флуоресценции в соответствии с рекомендациями изготовителя (см. руководства по эксплуатации прибора).
2. Получите гистограмму зависимости бокового рассеяния [SS] или логарифма бокового рассеяния [LSS] от прямого рассеяния [FS].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Настройте растровое изображение, настроив селекцию на самую большую наблюдаемую популяцию (см. Рисунок 1).

Рисунок 1. Двухпараметрическая гистограмма зависимости SS от FS для идентификации лимфоцитов.



4. Получите логарифмическую шкалу флуоресценции для данной популяции клеток. Процентные значения положительных популяций можно определить, установив отчетливый пик флуоресценции (один цвет) или настроив статистику по квадрантам (два цвета). Подробные инструкции см. в справочном руководстве по проточному цитометру.

Для определенных низкочувствительных маркеров в некоторых лабораториях может потребоваться перемещение настройки курсора с использованием изотипических контрольных клеток. Для получения оптимальных результатов выполните анализ на однопараметрической гистограмме и установите курсоры на область разделения между положительной и отрицательной популяциями.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.
2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо третьих лиц, либо непреодолимой силы.
3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер» 109004, г. Москва, ул. Станиславского, д.21, стр.3
Тел./факс, e-mail: (495) 9846730/(495) 228-67-00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Комплект контрольных клеток COULTER CYTO-TROL
REF 6604248 - 50 тестов

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

Контрольные клетки CYTO-TROL
5 флаконов (≥3,5 x 10^6 клеток/флакон)
Восстановительный буфер
5 x 1 mL/флакон

Для получения дополнительной информации или в случае повреждения продукта обращайтесь в службу поддержки клиентов компании Beckman Coulter 800-742-2345 (США или Канада) или обратитесь к региональному представителю компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

СВЕДЕНИЯ О ПЕРЕРАБОТКЕ И ИСПРАВЛЕНИИ ИЗДАНИЯ

Редакция ZD, 01/2018

Изменения были внесены в:

- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ
- Рисунок 1

Редакция ZE, 07/2018

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Редакция ZF, 10/2018

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT/ COULTER CLONE Mo2-FITC, Mo2-RD1

REF 6604114 — 50 тестов
REF 6604500 — 50 тестов

Ч.№ 4236037-KE

	Mo2-FITC	Mo2-RD1
Специфичность	CD14	CD14
Клон	116	116
Гибридома	P3/NS1/1-AG4-1 x BALB/c	P3/NS1/1-AG4-1 x BALB/c
Иммуноген	Осажденные мононуклеарные клетки периферической крови человека	Осажденные мононуклеарные клетки периферической крови человека
Цепь Ig	IgM	IgM
Вид	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость или кондиционированная среда	Асцитическая жидкость или кондиционированная среда
Очистка	Гель-фильтрационная хроматография	Гель-фильтрационная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 486—509 нм / Излучение при 504—541 нм	Возбуждение при 486—580 нм / Излучение при 568—590 нм
Конъюгация	FITC (флуоресцин изотиоцианат)	RD1 (фикоэритрин)
Молярное отношение	FITC/белок: 20—30	RD1/белок: 0,5—1,5
Определение рассеяния	Переднее и/или боковое	Переднее и/или боковое

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или Mo2-FITC (CD14) представляет собой реактив с флуоресцирующими моноклональными антителами мыши, предназначенный для выявления и количественного определения доли Mo2+ моноцитов в цельной крови методом проточной цитометрии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Mo2, мышиное моноклональное антитело, член гетерогенного кластера моноклональных антител, распознающих наиболее зрелые моноциты.[1,2] Сообщается, что молекулярная масса антигена, распознаваемого антителом Mo2, составляет 55 кДа.[1,3] Хотя способность реагировать с тем же гликопротеином 55 кДа обнаруживает сходное моноклональное антитело MY4 (CD14), Mo2 и MY4 проявляют специфичность к разным эпитопам.[2]

Было показано, что антитела Mo2 реагируют примерно с 58—84 % моноцитами периферической крови.[4,5] Антитела Mo2 реагируют с антигеном миелоидной дифференцировки, этот антиген не обнаруживается на клетках-предшественниках миелоидного ряда, включая промиелоциты, он представляется характерным признаком поздней стадии дифференцировки линии миелоидная клетка — моноцит — макрофаг (моноцит).[5,6]

МЕТОД АНАЛИЗА

Этот тест основан на способности моноклональных антител связываться с поверхностью клеток, экспрессирующих отдельные антигенные детерминанты. CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или Mo2-FITC представляют собой мышиные моноклональные антитела, специфичные к клеточному поверхностному антигену. Специфическое окрашивание клеток осуществляется путем инкубации цельной крови с реагентом CYTO-STAT/COULTER CLONE. Эритроциты лизируются, а оставшиеся лейкоциты подвергаются анализу методом проточной цитометрии с использованием селектора моноцитов. В каждой пробе определяют долю положительно окрашенных моноцитов. Для оценки неспецифической фоновой флуоресценции используется дублирование пробы цельной крови с окраской изотипичным контрольным реагентом CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-RD1 или MsIgM-FITC. (Этикетка на реагенте изотипичного контроля должна соответствовать этикетке на реагенте моноклональном антителе.)

РЕАГЕНТЫ

См. таблицу выше.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Mo2-FITC: концентрация антител 0,55 мкг/тест.
Mo2-RD1: концентрация антител 1,1 мкг/тест.

Окончательная концентрация реагентов, не являющихся антителами в 0,5 мл (1 ампула) составляет: 0,2 % BSA, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1 % NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com***.

1. Данный реагент содержит азид натрия. В кислой среде из азида натрия образуется азотистоводородная кислота, крайне токсичное соединение. При утилизации азидные соединения должны смываться проточной водой. Для избежания отложения материалов в металлических трубах, в результате чего может возникать угроза взрыва, рекомендуется соблюдать эту меру предосторожности. В случае контакта с глазами или кожей промыть их избыточным количеством воды.
2. Не используйте антитела после истечения срока хранения, указанного на этикетке.
3. С пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими возбудителей инфекционных заболеваний и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
4. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания материала проб на кожу и слизистые оболочки.
5. При хранении или инкубировании не подвергайте реагенты воздействию интенсивного освещения.
6. При использовании продолжительности или температуры инкубирования или центрифугирования, отличающейся от указанной, результаты могут оказаться неверными.
7. Избегайте микробного загрязнения реагентов, в противном случае возможно получение ошибочных результатов.
8. Ядовит при употреблении внутрь.
9. При попадании на кожу немедленно обильно промойте участок кожи водой.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Нет. Моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE используются непосредственно из ампулы, разбавление или центрифугирование не требуется.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Этот реагент сохраняет стабильность в течение периода, указанного на этикетке, в случае хранения при температуре 2—8 °C. Избегать замораживания, не подвергать воздействию света. Перед использованием все реагенты должны быть подогреты до температуры 20—25 °C.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств реагентов* или любые серьезные отклонения в показаниях, полученных для контрольных проб, могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагенты использовать нельзя.

***Обычный вид реагентов**

С маркировкой RD1:	прозрачная бесцветная или розоватая жидкость
С маркировкой FITC:	прозрачная бесцветная или желтоватая жидкость

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! Стабильность проб крови может меняться в значительных пределах. Для получения оптимальных результатов анализ следует начать в течение 6 часов после пункции вены. Неокрашенная кровь с добавленным антикоагулянтом до начала обработки должна храниться при температуре 20—25 °C. Не охлаждать.

Пробу венозной крови необходимо получать асептически, путем пунктирования вены, она должна находиться в пробирке для сбора крови с подходящим антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА). Подробнее об особенностях сбора крови методом венепункции и интерферирующих условиях см. «Процедуры сбора образцов крови для диагностики методом венепункции (H3), одобренное издание», опубликованное Институтом клинических и лабораторных стандартов. Для каждого теста требуется 100 мкл цельной крови. Необходимо набрать достаточное для проведения теста, контроля и получения запаса аутологической плазмы для разбавления образца (если потребуется) количество крови (от 1 до 2 мл на пробирку). Необходимо произвести подсчет количества лейкоцитов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МЕТОДИКА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ CYTO-STAT/COULTER CLONE

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Моноклональные антитела
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1
REF 6604500 — 50 тестов (0,5 мл)

ИЛИ

Моноклональные антитела
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC
REF 6604114 — 50 тестов (0,5 мл)

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Реагент для лизирования эритроцитов

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

Разбавитель (если требуется) аутологическая плазма

ИЛИ

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

Разбавитель (если требуется) аутологическая плазма

ИЛИ

Набор реагентов для лизирования цельной крови, Ч.№ 6602764 — 100 тестов, Ч.№ 6603152 — 300 тестов

Разбавитель (если требуется) Физиологический раствор с фосфатным буфером (pH 7,2), Ч.№ 6603369

Изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-RD1, Ч.№ 6604117 — 50 тестов (0,5 мл)

ИЛИ

Изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-FITC, Ч.№ 6603877 — 50 тестов (0,5 мл)

Силиконизирующее средство для стеклянной посуды

Пробирки 12 x 75 мм

Пробирки для сбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Переносящие пипетки

Вращательная мешалка

Проточный цитометр (см. раздел «Требования к инструментам»)

Счетчик клеток или гемоцитометр

Микропипетки

ТРЕБОВАНИЯ К ИНСТРУМЕНТАМ

Проточный цитометр, обеспечивающий возбуждение и измерение излучения рассеивания и флуоресценции, как указано в таблице на странице 1 для конкретного продукта. При настройке компенсации ФЭУ напряжения и флуоресценции перед анализом, пользователи должны обратиться к инструкциям из руководства пользователя от производителя инструмента.

ПРОЦЕДУРА

1. Оптимальное окрашивание достигается при количестве лейкоцитов в пределах 3—10 x 10^3 клеток/мкл. Если количество лейкоцитов превосходит уровень 10 x 10^3 клеток/мкл, образец необходимо разбавить, а если количеств лейкоцитов меньше 3 x 10^3 клеток/мкл, необходимо выполнить центрифугирование с последующим повторным получением суспензии, итоговое количество лейкоцитов должно входить в диапазон 3—10 x 10^3 клеток/мкл. При использовании системы реагентов COULTER IMMUNOPREP рекомендуемым разбавителем является аутологичная плазма. При использовании набора реагентов для лизирования цельной крови в качестве предпочтительного разбавителя нужно использовать физиологический раствор с фосфатным буфером (pH 7,2, Ч.№ 6603369).
2. С каждой пробой следует выполнять прогон соответствующего изотипического контроля (в данном случае, CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-RD1 или MsIgM-FITC). Для каждой пробы необходимо пометить две пробирки 12 x 75 мм, одну для моноклональных антител, другую для изотипического контроля. Добавьте 100 мкл образца венозной крови в каждую пробирку. Соблюдайте осторожность, чтобы избежать попадания крови на верхнюю и боковые части пробирок; в противном случае лизис может быть неполным.
3. Добавьте 10 мкл реагента CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или Mo2-FITC или изотипического контроля CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgM-RD1 или MsIgM-FITC в промаркированные пробирки.
4. Осторожно смешайте. Если используется система реагентов COULTER IMMUNOPREP, инкубируйте реакционную смесь при 20—25 °C в течении 10—12 минут. Если используется набор реагентов для лизирования цельной крови, инкубируйте реакционную смесь при 20—25 °C в течении 45—47 минут.

ВАЖНО! Если возле горловины пробирки остались капли крови, их следует удалить, в противном случае нелизированные эритроциты могут загрязнить готовый образец и стать причиной искажения результатов. Для удаления капель можно использовать ватную палочку.

5. Выполните лизирование эритроцитов в каждой пробирке, руководствуясь методикой, рекомендуемой для выбранного метода лизирования (система реагентов COULTER IMMUNOPREP для рабочих станций COULTER Q-PREP, MULTI-Q-PREP, TQ-Prep или набор реагентов для лизирования цельной крови).

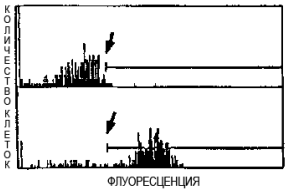
АНАЛИЗ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

ВНИМАНИЕ! Если лазер проточного цитометра смещен или если селекторы были установлены неправильно, результаты могут оказаться ошибочными.

1. Выполняйте анализ клеток на надлежащем образом стандартизированном проточном цитометре, с настройкой селектора моноцитов согласно руководства по эксплуатации инструмента. Для обеспечения максимальной жизнеспособности выполняйте анализ окрашенных клеток своевременно.
2. На следующих гистограммах показаны примеры нормальных образцов, исследованных на проточном цитометре COULTER EPICS XL/XL-MCL с селектором моноцитов. Курсор (↑) установлен таким образом, чтобы, используя изотипический контроль, отсечь 98±1 % результатов неспецифического окрашивания. Флуоресценция слева от курсора является результатом неспецифического окрашивания, а справа — расценивается как результат специфического окрашивания.
3. Описание того, как изотипический контроль используется при анализе результатов проточной цитометрии, см. в разделе «Процедура контроля качества ».

Прямое окрашивание поверхности клеток





АБСОЛЮТНЫЙ ПОДСЧЕТ

Чтобы выполнить абсолютный подсчет, используйте следующую формулу.

Абсолютные значения = Общее количество лейкоцитов (клеток/мкл) x % моноцитов x % положительно-окрашенных клеток/10^4

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Чтобы удостовериться в соблюдении надлежащих рабочих условий, в качестве положительного контроля следует выполнить прогон на материале, полученном от обычного, практически здорового донора. Границы нормы должны быть установлены в пределах местной популяции обычных доноров.

Неспецифическое Fc связывание антител с гранулоцитами, имеющимися в образце, можно исключить путем надлежащей селекции моноцитов в проточном цитометре.

Для исключения влияния неспецифического Fc связывания антител с моноцитами, для каждого образца используется соответствующий изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE. Популяция ярко флуоресцирующих положительно окрашенных моноцитов измеряется с селектором, установленным для исключения низкоуровневой неспецифической флуоресценции.

Неспецифическая флуоресценция выше курсора фонового уровня (если курсор установлен таким образом, чтобы отсекать 98±1 % неспецифического окрашивания) у здоровых лиц обычно не превышает 1—2 %. Если фоновый уровень выше курсора в любом из контрольных образцов больше 1—2 %, результаты теста могут быть ошибочны.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для получения оптимального результата пробы крови должны быть окрашены в течение 6 часов от момента их получения. До окрашивания и анализа пробы должны оставаться в пробирках, в которых собирали кровь, их следует хранить при комнатной температуре. Не охлаждать. При длительном хранении или охлаждении образцов результаты могут оказаться неверными. Для обеспечения максимальной жизнеспособности выполняйте анализ окрашенных клеток своевременно.
2. С некоторыми пациентами могут возникать особые проблемы ввиду измененного или очень низкого числа клеток некоторых клеточных популяций.
3. Данные реагенты не подлежат разбавлению, разделению на порции или заморозке. Используйте реагенты только в состоянии исходной упаковки.
4. Эти реагенты предназначены исключительно для проточной цитометрии.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Эти реагенты предназначены для использования с препаратами цельной крови. Не рекомендуется использовать их со свежими или замороженными препаратами мононуклеарных клеток.
6. Патологические состояния не всегда сопровождаются патологическими изменениями процентного содержания популяций лейкоцитов. У больного человека процентное соотношение лейкоцитов может быть такими же, как и у здорового. Используйте результаты анализа с учетом клинических и других диагностических данных.
7. Не все эритроциты могут лизироваться при следующих условиях: ядросодержащие эритроциты, патологическая концентрация белка или гемоглобинопатии. Это может стать причиной получения ошибочно заниженных результатов, поскольку не подвергшиеся лизису эритроциты будут подсчитаны как лейкоциты.
8. Избыточно длительное воздействие литических реагентов на клетки может привести к разрушению лейкоцитов.
9. Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, могут быть ошибочными, если лазер неверно отъюстирован или неправильно установлены селекторы.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Образцы крови были получены от популяции практически здоровых мужчин и женщин. В эту популяцию входили взрослые люди в возрасте от 19 до 65 лет разных рас. Образцы окрашивали моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC. Нормальные значения содержания Mo2+ клеток в цельной крови, определенные методом проточной цитометрии (проточным цитометром COULTER EPICS Profile или XL-MCL), представлены в следующей таблице. Количество лейкоцитов определяли с помощью инструмента COULTER S-Plus IV или STKS. Значения выражены в % от общей популяции (лимфоциты плюс моноциты плюс гранулоциты) и в абсолютных числах (10^3 клеток/мкл). Значения представлены исключительно в качестве пояснений. Каждая лаборатория обязана установить свой уровень ожидаемых значений, используя местную популяцию здоровых доноров.

Цельная кровь

	n	Мин.	Макс.	Среднее, ±1 SD (Стандартное отклонение)
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1				
%Mo2+ клеток	50	4	11	6 ±2
абсолютное количество Mo2+ клеток	50	208	755	429 ±126
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC				
%Mo2+ клеток	17	4	14	8 ±3
абсолютное количество Mo2+ клеток	17	276	770	448 ±136

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Было показано, что с антителами Mo2 реагирует 58—84 % моноцитов периферической крови.[4,5] Антиген Mo2 экспрессируют 6—16 % нормальных клеток костного мозга, зрелые моноциты и некоторые макрофаги, включая перитонеальные макрофаги и макрофаги, происходящие в культуре от моноцитов.[1] Он не образуется в культурах клеток клеточной линии HL-60, но экспрессируется промиелоцитарными клетками HL-60, индуцированными для дифференцировки в макрофаги.[1,4] Антиген Mo2 не экспрессируют Т и В лимфоциты, нулевые клетки и гранулоциты.[4]

Описание выполнения контроля неспецифического окрашивания моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 и CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC см. в разделе «Процедура контроля качества».

КОРРЕЛЯЦИЯ

Лизированная цельная кровь нормальных доноров была испытана методом проточной цитометрии с использованием CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1, CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC, COULTER CLONE Mo2-RD1 и COULTER CLONE Mo2-FITC. Полученные данные представлены в следующей таблице, они свидетельствуют, что указанные реагенты являются эквивалентными по реактивности в отношении моноцитов периферической крови. Значения выражены в % от общей популяции (лимфоциты плюс моноциты плюс гранулоциты).

Цельная кровь

		Среднее значение %		
Реагент	n	Mo2+	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1	50	6	2	30
CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC	17	8	3	37
COULTER CLONE Mo2-RD1	16	9	1	11
COULTER CLONE Mo2-FITC	32	7	2	28

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В течение дня

В один и тот же день с использованием проточного цитометра COULTER EPICS XL-MCL было выполнено тридцать одно повторное измерение на каждом из трех уровней концентраций моноцитов. Из материала одного нормального донора были селективно удалены моноциты, положительно реагирующие с антителами Mo2. Затем клетки были разбавлены нормальным донорским материалом для получения различных концентраций. Клетки окрашивали моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC. Значения выражены в % от общей популяции (лимфоциты плюс моноциты плюс гранулоциты).

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1

Уровень	Mo2+ Среднее %	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
1	4	0,1	4
2	3	0,1	5
3	2	0,1	5

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC

Уровень	Mo2+ Среднее %	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
1	4	0,1	4
2	3	0,1	6
3	2	0,1	9

Межлабораторная

Исследования были выполнены в один и тот же день разными лабораториями Beckman Coulter с использованием разных проточных цитометров Beckman Coulter. На каждом инструменте выполнено тридцать одно повторное измерение. Для всех измерений использованы пробы крови от одного нормального донора-человека. Образцы окрашивали моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1 или CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC. Значения выражены в % от общей популяции (лимфоциты плюс моноциты плюс гранулоциты).

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1

Лаборатория/инструмент	Mo2+ Среднее %	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
1 XL-MCL	5	0,1	3
2 XL-MCL	6	0,1	2
3 FC 500	4	0,2	5

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC

Лаборатория/инструмент	Mo2+ Среднее %	±1 SD (Стандартное отклонение)	%CV (Коэффициент вариации)
1 XL-MCL	8	0,2	2
2 XL-MCL	9	0,4	4
3 FC 500	8	0,2	2

ССЫЛКИ

1. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, and Schlossman SF, eds.: 1984. Leukocyte Typing: Berlin: Springer-Verlag, p. 108, 425-426, 428.
2. McMichael AJ, ed.: 1987. Leukocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens. Oxford: Oxford University Press, p. 586-589, Appendix E.
3. Todd RF, van Agthoven A, Schlossman SF, and Terhorst C.: 1982. Structural analysis of differentiation antigens Mo1 and Mo2 on human monocytes. Hybridoma 1:329-337.
4. Todd RF, Nadler LM, and Schlossman SF: 1981. Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies. J. Immunol. 126:1435-1442.
5. Todd RF, and Schlossman SF: 1982. Analysis of antigenic determinants on human monocytes and macrophages. Blood 59:775-786.
6. Todd RF, Griffin JD, Ritz BJ, Nadler LM, Abrams T, and Schlossman SF:1981. Expression of normal monocyte-macrophage differentiation antigens on HL60 promyelocytes undergoing differentiation induced by leukocyte conditioned-medium or phorbol diester. Leukemia Res. 5:491-495.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1
REF 6604500 — 50 тестов (0,5 мл)

Моноклональные антитела CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-FITC
REF 6604114 — 50 тестов (0,5 мл)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с локальным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

По вопросам качества продукции обращаться к
представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

Версия Статус

Версия KC, 02/2013

Изменения были внесены в:

- Добавлены новые языки.

Версия KD, 12/2014

Изменения были внесены в:

- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Версия KE, 09/2016

Изменения были внесены в:

- Обновленный адрес представительства в ЕС

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT / COULTER CLONE T8-RD1/T4-FITC

50 тестов

PN 4236208-FD

	T8-RD1	T8-FITC
Специфичность	CD8	CD4
Клон	SFCI21 Thy2D3	SFCI12T4D11
Гибридома	NS/1-AG4 x BALB/c	NS/1-AG4 x BALB/c
Иммуноген	Тимоциты человека	Т-клетки периферической крови человека
Ig цепь	IgG1	IgG1
Хозяин	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Поглощение 486-575 нм / эмиссия 568-590 нм	Поглощение 468-509 нм / эмиссия 504-541 нм
Конъюгат	RD1 (PE)	FITC
Молярное отношение	RD1/Ig: 0.5-1.5	FITC/Ig: 5-10

Моноклональные антитела

для диагностики in vitro

НАЗНАЧЕНИЕ

CYTO-STAT / COULTER CLONE T8-RD1 / T4-FITC представляет собой двойной флуоресцентный реагент, состоящий из мышиных моноклональных антител T4 (CD4) и T8 (CD8) 1. Каждое антитело помечено флуоресцентным маркером другого цвета. Этот реагент одновременно идентифицирует и перечисляет процентное содержание T4 + (хелперы) и T8 + (цитотоксические) лимфоцитов в цельной крови методом проточной цитометрии.

СОСТАВ РЕАГЕНТА

Конечная концентрация реагентов, не являющихся антителами, в 0,5 мл (1 флакон) составляет 0,2% BSA, 0,01 M фосфат калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Не используйте антитела после истечения срока годности, указанного на этикетке. Образцы и все материалы, соприкасающиеся с ними, должны обрабатываться так, как если бы они могли передавать инфекцию, и утилизироваться с соблюдением надлежащих мер предосторожности. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта образцов с кожей и слизистыми оболочками. Не подвергайте реагенты воздействию сильного света во время хранения или инкубации.Время инкубации или центрифуги или температуры, отличные от указанных, могут привести к ошибочным результатам.

Избегайте микробной контаминации реагентов, так как это может привести к неправильным результатам.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Моноклональное антитело CYTO-STAT / COULTER CLONE и изотипические контрольные реагенты используются непосредственно из флакона без необходимости разбавления или центрифугирования.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты стабильны в течение периода, указанного на этикетке, при хранении при 2-8 ° C. Избегайте замерзания и воздействия света. Все реагенты должны быть доведены до 20-25 ° C перед использованием.

ПРОЦЕДУРА ОКРАСКИ ОБРАЗЦА

Оптимальное окрашивание достигается при количестве лейкоцитов в диапазоне 3-10 x 106 клеток / мл. Количество лейкоцитов, превышающее 10 x 106 клеток / мл, требует разбавления, а количество лейкоцитов ниже 3 x 106 клеток / мл требует центрифугирования и ресуспендирования для достижения значений в диапазоне 3-10 x 106 клеток / мл.

ВАЖНО: если капли крови остаются вокруг верхней части пробирки, их необходимо удалить, иначе нелизированные эритроциты могут загрязнить конечный образец и исказить результаты. Аппликатор с хлопковым наконечником может быть использован для удаления.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ССЫЛКИ

1. McMichael, AJ, ed: Leukocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens: 1987. Oxford: Oxford University Press, p 202, 206.
2. Morimoto, C, Letvin, NL, Distaso, JA, Aldrich, WR and Schlossman, SF: 1985. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. J Immunol 134: 1508-1515.
3. Morimoto, C, Letvin, NL, Distaso, JA, Brown, HM and Schlossman, SF: 1986. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. Eur J Immunol 16: 198-204.
4. Reinherz, EL, Meuer, SC and Schlossman, SF: 1983. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunol Today 4: 5-8.
5. Reinherz, EL, Morimoto, C, Fitzgerald, KA, Hussey, RE, Daley, JF and Schlossman, SF: 1982. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J Immunol 128: 463-468.
6. Meuer, SC, Schlossman, SF and Reinherz, EL: 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility regions. Proc Natl Acad Sci USA 79: 4395-4399.
7. Reinherz, EL, Hussey, RE, Fitzgerald, K, Snow, P, Terhorst, C and Schlossman, SF: 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. Nature 294: 168-170.
8. Reinherz, EL, Cooper, MD and Schlossman, SF: 1981. Abnormalities of T cell maturation and regulation in human beings with immunodeficiency disorders. J Clin Invest 68: 699-705.
9. Schmidt, RE: 1989. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. Blut 59:200-206.
10. de Martini, RM and Parker, JW: 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3: 56-70.
11. Fauci, AS: 1988. The human immunodeficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239: 617-622.
12. Collier, AC, Meyers, JD, Corey, L, Murphy, VL, Roberts, PL and Handsfield, HH: 1987. Cytomegalovirus infection in homosexual men. Relationship to sexual practices, antibody to human immunodeficiency virus, and cell-mediated immunity. Am J Med 82: 593-601.
13. Taylor, MGJ, Fahey, JL, Detels, R and Giorgi, JV: 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2: 114-124.
14. Morimoto, C, Hafler, DA, Weiner, HL, Letvin, NL, Hagan, M, Daley, J and Schlossman, SF: 1987. Selective loss of the suppressor-inducer T-cell subset in progressive multiple sclerosis. Analysis with anti-2H4 monoclonal antibody. N Engl J Med 316: 67-72.
15. Reinherz, EL, Weiner, HL, Hauser, SL, Cohen, JA, Distaso, JA and Schlossman, SF: 1980. Loss of suppressor T cells in active multiple sclerosis. Analysis with monoclonal antibodies. N Engl J Med 303: 125-129.
16. Weiner, JL, Hafler, DA, Fallis, RJ, Johnson, D, Ault, KA and Hauser, SL: 1984. Altered blood T-cell subsets in patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 6: 115-121.
17. Smolen, JS, Chused, TM, Leiserson, WM, Reeves, JP, Alling, DW and Steinberg, AD: 1982. Heterogeneity of immunoregulatory T cell subsets in systemic lupus erythematosus. Am J Med 727: 783-790.
18. Smolen, JS, Morimoto, C, Steinberg, AD, Wolf, A, Schlossman, SF, Steinberg, RT, Penne, E, Reinherz, EL, Rerchlin, M and Chused, TM: 1985. Systemic lupus erythematosus: delineation of subpopulations by clinical, serologic and T cell marker analysis. Am J Med Sci 289: 139-147.
19. Morimoto, C, Reinherz, EL, Schlossman, SF, Shur, PH, Mills, JA and Steinberg, SD: 1980. Alterations in immunoregulatory T cell subsets in active systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 66: 1171-1174.
20. Raziuddin, S, Nur, MA and Alwabel, AA: 1989. Selective loss of the CD4+ inducers of suppressor T cell subsets (2H4+) in active systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 16: 1315-1319.
21. Sato, K, Miyasaka, N, Yamaoka, K, Okuda, M, Yata, J and Nishioka, K: 1987. Quantitative defect of CD4+2H4+ cells in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 30: 1407-1411.
22. Ramos, EL, Turka, LA, Leggat, JE, Wood, IG, Milford, EL and Carpenter, CB: 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47: 465-471.
23. Pedrazzini, AS, Freedman, AS, Andersen, J, Heflin, L, Anderson, K, Takvorian, R, Canellos, GP, Whitman, J, Coral, F, Ritz, J and Nadler, LM: 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood 74: 2203-2211.
24. Reinherz, EL, Kung, PC, Goldstein, G and Schlossman, SF: 1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J Immunol 123: 1312-1317.
25. Reinherz, EL, Haynes, BF, Nadler, LM and Bernstein, ID, eds: Leukocyte Typing II, Human T Lymphocytes: 1986. New York: Springer-Verlag, p 8-9.
26. Koepke JA and Landay AL. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol, 1989; 52:19-27.

PRODUCT AVAILABILITY

CYTO-STAT/COULTER CLONE T8-RD1/T4-FITC Monoclonal Antibody,
1ËËB 6604614 50 tests (0.5 mL)

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

For additional information or if damaged product is received, call Beckman Coulter Customer Service at 800-742-2345 (USA or Canada) or contact your local Beckman Coulter Representative.

Glossary of Symbols is available at techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

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

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A. 22,
rue Juste-Olivier Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland Tel:
+41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.

All Rights Reserved.

Revision History

Revision FD, 10/2016

Changes were made to:

- Update of EC Rep Address

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT/ COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1

REF 6605015 - 50 тестов

Ч.№ 4236282-JE

CE BECKMAN COULTER

	CD3 (IgG1)-FITC	B4-RD1
Специфичность	CD3	CD19
Клон	UCHT1[24]	89B[11]
Гибридома	P3/NS1/1-AG4 x BALB/c	NS/1-AG4 x BALB/c
Иммуноген	Человеческие лимфоциты и лимфоциты периферической крови от пациента с синдромом Сезари	Опухолевые клетки от пациентов с В-клеточным хроническим лимфолейкозом
Цепь Ig	IgG1[1-3,11,24]	IgG1[1-3,11,24]
Вид	Мышь	Мышь
Источник	Кондиционированная среда	Кондиционированная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 468-509 nm / Излучение при 504-541 nm	Возбуждение при 486-575 nm / Излучение при 568-590 nm
Конъюгация	FITC (Флуоресцин изотиоцианат)	RD1 (Фикоэритрин)
Молярное отношение	FITC/Белок: 3-6	RD1/Белок: 0,5-1,5
Определение светорассеивания	Переднее и (или) боковое	Переднее и (или) боковое

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/ B4-RD1 представляет собой реагент с двойной флуоресценцией, состоящий из двух мышиных моноклональных антител. Каждое из антител помечено особым маркером цветовой флуоресценции. Этот реагент позволяет выполнять одновременно определение и подсчет лимфоцитов CD3+ [CD3 (IgG1)][1,2] и CD19+ (B4)[2,3] в цельной крови при проточной цитометрии.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ И ПОЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов в периферической крови человека состоит из клеток трех типов: Т-клеток (образующихся в вилочковой железе), В-клеток (образующихся в костном мозге), и нулевых клеток.[4] Морфология данных клеток неразличима при микроскопии, однако клетки различаются по антигенным характеристикам своих клеточных мембран.

Т-лимфоциты и В-лимфоциты играют центральную роль в работе иммунной системы. Разные подтипы Т-лимфоцитов могут распознавать специфические антигены, выполнять эффекторные функции и/или контролировать тип и интенсивность клеточного и/или гуморального иммунного ответа. В результате активации антигенами или макрофагами через Т-лимфоциты, специфические В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые вырабатывают и секретируют специфические иммуноглобулины (Ig).

В прошлом определение и подсчет Т- и В-лимфоцитов выполнялись с помощью таких клеточных маркеров, как рецепторы бараньих эритроцитов на Т-лимфоцитах (Е-розетка) и Ig на поверхностной мембране В-лимфоцитов.[5,6] Метод Е-розетки специфичен для определения Т-лимфоцитов, однако он ограничен, поскольку предоставляет возможность только визуального определения и ручного подсчета комплексов бараньих эритроцитов с Т-лимфоцитами при световой микроскопии. Измерение Ig на поверхностной мембране для определения и подсчета В-лимфоцитов также имеет ограничения, поскольку другие популяции клеток могут иметь аналогичные Ig на поверхностной мембране и/или связывать Ig через рецепторы к Fc-фрагменту молекулы IgG, что приводит к получению недостоверных результатов.

В дальнейшем для определения и подсчета Т- и В-лимфоцитов были разработаны моноклональные антитела.[6,7] В сравнении с относительно неспецифичными поликлональными антителами (гетерологичная иммунная сыворотка), вырабатываемыми к этим клеточным популяциям, моноклональные антитела определяют специфичные поверхностные антигены Т- и В-клеток. Этим достигается не только более точное и воспроизводимое измерение количества лимфоцитов, но также определение стадий дифференцировки Т- и В-клеток при использовании в сочетании с другими клеточными маркерами (TdT, HLA-D-связанный антиген, Ig поверхностной мембраны).

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

Экспрессия всех поверхностных антигенов Т-лимфоцитов осуществляется в следующей последовательности: CD7 (ранний протимоцит); CD2 (средний протимоцит); CD5 (незрелый тимоцит), цитоплазматический CD3 (незрелый и промежуточный тимоцит) и CD3 (зрелый тимоцит).[2,7] Далее следует совместная экспрессия (промежуточный тимоцит) и раздельная экспрессия (зрелый тимоцит) клеточных поверхностных антигенов CD4 (индуцирующий) и CD8 (супрессорный/цитотоксический).[2,7] После экспрессии антигены CD7, CD2, CD5 и CD3, а также CD4 или CD8 экспрессируются совместно на протяжении оставшегося периода дифференцировки Т-лимфоцитов, включая неактивированные и активированные зрелые Т-лимфоциты периферической крови и лимфоидной ткани.

Экспрессия общих поверхностных антигенов В-лимфоцитов В-лимфоцитами осуществляется в следующей последовательности: CD19 (коммитированный предшественник В-клеток/пре-пре-В-клетка); CD20 (ранний предшественник В-клеток).[2,3,7] После экспрессии антигены CD19 и CD20 экспрессируются совместно на протяжении оставшегося периода дифференцировки В-лимфоцитов (в том числе на неактивированных и активированных зрелых В-лимфоцитах периферической крови и лимфоидной ткани). Оба антигена исчезают на последней стадии дифференцировки В-лимфоцита (плазматической клетки).

CD21 (неактивированные зрелые В-лимфоциты периферической крови и лимфоидной ткани) и CD22 (предшественники В-клеток) представляют собой временные поверхностные антигены В-клеток, которые исчезают во время активации В-лимфоцитов периферической крови и лимфоидной ткани.[2,3] Поверхностной экспрессии CD22 предшествует экспрессия цитоплазматического CD22 (пре-пре-В-клетка).

Реагент моноклональных антител, специфичный ко всем поверхностным антигенам Т-клеток или В-клеток, можно использовать для определения и подсчета зрелых Т- или В-лимфоцитов соответственно. Реагент моноклональных антител, специфичный к конкретному клеточному поверхностному антигену, можно также использовать для определения зрелости (степени дифференцировки) и/или функционального состояния популяции лимфоцитов. В данном тесте моноклональные антитела CD3 (IgG1) и B4 используются для определения и подсчета в периферической крови Т- и В-клеток с помощью общего поверхностного антигена Т-клеток и общего поверхностного антигена В-клеток, CD3 и CD19 соответственно. Кроме того, данный тест позволяет одновременно определять разные популяции лимфоцитов.

CD3 (IgG1)

Антиген CD3 состоит из двух гликопротеинов с молекулярным весом 20 и 25 kd.[2] Этот антиген специфичен для всей линии Т-клеток, в норме он присутствует на поверхности зрелых тимоцитов, а также незрелых и активированных Т-лимфоцитов периферической крови (как индуцирующей, так и супрессорной/цитотоксической популяции, а также на некотором количестве натуральных киллеров.[1,2,4,7,8] Он не определяется на В-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах и тромбоцитах.[2] Экспрессии антигена CD3 на поверхности клетки предшествует его появление в цитоплазме незрелых и промежуточных тимоцитов.[7]

Антиген CD3 образует комплекс с рецептором Т-лимфоцитов (комплекс CD3/Ti или CD3/TCR), этот антиген необходим для передачи сигнала, запускающего пролиферацию Т-лимфоцитов после антиген-специфичного распознавания комплексом Ti (или TCR).[2,9,10] Антитела к CD3 (IgG1) обладают митогенным действием в отношении Т-лимфоцитов периферической крови.[2]

B4

Антиген CD19 представляет собой гликопротеин с молекулярным весом 95 kd.[2,3] Это ранний поверхностный антиген, специфичный к линии В-клеток, в норме он присутствует, начиная с ранних стадий развития предшественников В-клеток до последней стадии дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки.[2,3,7,11] Он определяется более чем на 90% В-лимфоцитов, выделенных из периферической крови, селезенки, лимфатических узлов и миндалин, а также приблизительно на 5% клеток костного мозга.[3] В кроветворной системе этот антиген определяется только на нормальных и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

опухолевых B-клетках.[3] Антиген CD19 не определяется на T-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах и тромбоцитах.[3,11]

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

T

B

Определение процентного содержания и абсолютного значения T- и B-лимфоцитов можно использовать в качестве дополнительного метода оценки состояния иммунной системы при известных или неизвестных заболеваниях[12-20], а также для мониторинга уровней лимфоцитов после трансплантации органов.[16,21-23]

Например, определение патологических уровней T- и B-лимфоцитов может помочь при диагностике и/или прогнозировании течения не установленных патологических состояний у пациентов с пониженным количеством лейкоцитов. Подсчет T- и B-лимфоцитов, в сочетании с определением CD4+ (индуцирующих) и CD8+ (супрессорных/цитотоксических) T-лимфоцитов и соответствующих отношений CD4+/CD8+ можно использовать в качестве дополнительного средства при диагностике и прогнозировании иммунодефицита, в частности при инфицировании вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который является причиной синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД).[12,17-20] Процентное содержание T- и/или B-лимфоцитов изменяется после трансплантации органов (напр. почти, сердца, печени, легкого). Поэтому определение уровня T- и/или B-лимфоцитов может быть полезным в качестве дополнительного способа мониторинга этих клеточных популяций.

ПРИНЦИПЫ ТЕСТА

Данный тест основан на способности моноклональных антител связываться с отдельными антигенными детерминантами на поверхности клетки. CYTO-STAT/ COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1 представляет собой комбинацию двух мышиных моноклональных антител, каждое из которых специфично для отдельного поверхностного клеточного антигена. Специфичное окрашивание клеток осуществляется во время инкубации цельной крови с реагентом CYTO-STAT/COULTER CLONE. Оставшиеся в пробе лейкоциты анализируются методом проточной цитометрии с использованием гейтов лимфоцитов. Процентное содержание положительно окрашенных клеток определяется для каждого из четырех квадрантов: только положительная оранжевая флуоресценция, только положительная зеленая флуоресценция, двухцветное окрашивание, отсутствие окрашивания. Для оценки неспецифической фоновой флуоресценции использовались пробы цельной крови, окрашенные изотипическим контрольным реагентом CYTO-STAT/ COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC в двух экземплярах. (Этикетка для изотипического контрольного реагента должна соответствовать этикетке для моноклональных антител.)

РЕАГЕНТЫ

Смотрите таблицу странице 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Концентрация антител — 1,0/0,6 µg/тест.

В одном флаконе (0,5 mL) не содержащих антител реагентов содержится 0,2% BSA, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3, а также стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com***.

1. Данный реагент содержит азид натрия. Азид натрия в кислой среде образует азотисто-водородную кислоту, которая является крайне токсичным соединением. При утилизации азидные соединения необходимо смывать проточной водой. Данные меры предосторожности рекомендуется выполнять во избежание отложения в металлических трубах азидных соединений, являющихся взрывоопасными. При попадании на кожу или в глаза обильно промойте водой.
2. Не используйте антитела после истечения срока годности, указанного на этикетке.
3. С пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
4. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
5. Во время хранения или инкубации не подвергайте реагенты воздействию яркого света.
6. Длительность и температура инкубации и центрифугирования, отличные от указанных, могут привести к получению ошибочных результатов.
7. Избегайте микробной контаминации реагентов, в противном случае возможно получение неверных результатов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Не требуется. Моноклональные антитела и изотипические контрольные реагенты CYTO-STAT/ COULTER CLONE используются непосредственно из флакона, разбавление и центрифугирование не требуются.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты стабильны в течение периода, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Не замораживайте и не подвергайте воздействию света. Перед использованием доведите температуру всех реагентов до 20-25°C.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств реагента (в норме это прозрачная розовая жидкость) или значительные отклонения значений контрольных проб могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагент использовать нельзя.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

ОСТОРОЖНО: Стабильность проб крови крайне вариабельна. Для получения оптимальных результатов начинайте анализ в течение 6 часов после венепункции. До начала обработки температуру неокрашенной крови с добавлением антикоагулянта следует довести до 20-25°C. Не охлаждайте.

Получите пробу венозной крови методом венепункции, соблюдая правила асептики, в пробирку для сбора крови, используя соответствующий антикоагулянт (рекомендуется EDTA). Подробнее об особенностях сбора крови методом венепункции см. процедуры сбора образцов крови для диагностики методом венепункции Clinical and Laboratory Standards Institute "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3), Approved Edition". Для каждого теста требуется 100 µL цельной крови. Для выполнения теста и контрольной пробы возьмите достаточное количество крови (от 1 до 2 mL в каждой пробирке); если требуется разведение, следует иметь в наличии аутологичную плазму. Подсчет лейкоцитов и определение жизнеспособности клеток необходимо выполнять для каждого образца венозной крови, используя установленную в лаборатории процедуру. Рекомендуемое значение жизнеспособности составляет 90%, однако, в патологических образцах получение такого значения может быть затруднено.

ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT/COULTER CLONE

ПОСТАВЛЯЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Моноклональные антитела CYTO-STAT/ COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1,
REF 6605015 - 50 тестов (0,5 mL)

МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ

Реагент для лизиса эритроцитов (если необходим):

Комплект реагентов для лизиса цельной крови (Whole Blood Lysing Reagent Kit),
Ч.№ 6602764 - 100 тестов,
Ч.№ 6603152 - 300 тестов

Разбавитель (если необходим) – фосфатный буферизированный физиологический раствор (pH 7,2), Ч.№ 6603369

Моноклональные антитела CYTO-STAT/ COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56 (T-200)-FITC, Ч.№ 6603909 - 50 тестов (0,5 mL)

Изотипический контрольный реагент CYTO-STAT/ COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC, Ч.№ 6603796 - 50 тестов (0,5 mL)

Тестовые пробирки 12 x 75 mm

Пробирки для сбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется EDTA)

Переносящие пипетки

Микропипетки

Вортекс-миксер

Проточный цитометр (Обратитесь к главе Требуемое оборудование)

Счётчик клеток или гемацитометр

ТРЕБУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

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

ПРОЦЕДУРА

1. Оптимальное окрашивание достигается при количестве лейкоцитов в диапазоне 3-10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL). Если количество лейкоцитов превышает 10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL), то требуется разведение, если же количество лейкоцитов менее 3 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL), то требуется центрифугирование и повторное приготовление суспензии для достижения количества лейкоцитов 3-10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL). При использовании комплекта реагентов для лизиса цельной крови в качестве разбавителя рекомендуется использовать фосфатный

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

буферизированный физиологический раствор (Ч.№ 6603369).

Патологические пробы

a. Высокое содержание лейкоцитов [>10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL)]
   10-20 x 10^3: Разбавьте кровь 1:2.
   20-30 x 10^3: Разбавьте кровь 1:3.
   30-40 x 10^3: Разбавьте кровь 1:5.
   40-60 x 10^3: Разбавьте кровь 1:6.
   60-100 x 10^3: Разбавьте кровь 1:10.
   100-200 x 10^3: Разбавьте кровь 1:20.
b. Низкое содержание лейкоцитов [<3 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL)] - метод лейкоцитарной пленки
   1) Центрифугируйте кровь при температуре 20-25°C со скоростью 500 x g в течение 5 минут.
   2) Удаляя лейкоцитарную пленку пипеткой Пастера, отберите некоторое количество эритроцитов и плазмы, чтобы убедиться, что все лейкоциты удалены.
   3) Полностью восстановите клеточную суспензию, перемешав пробу несколько раз пипеткой Пастера.
   4) Определите концентрацию клеток, используя счётчик клеток или гемацитометр.
   5) С помощью разбавителя доведите концентрацию клеток до 10 x 10^3 клеток/mm^3 (или клеток/µL). Добавьте 100 µL к антителам и выполните стандартную процедуру.

2. С каждой пробой необходимо обрабатывать соответствующий изотипический контрольный реагент. Для каждой пробы промаркируйте две тестовых пробирки 12 x 75 mm, одну для моноклональных антител, другую для изотипического контрольного реагента. Добавьте 10 µL изотипического контрольного реагента CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/ B4-RD1 или CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG1-RD1/MsIgG1-FITC в промаркированные тестовые пробирки.
3. Добавьте 100 µL венозной крови в каждую тестовую пробирку. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы кровь не попала на верхнюю и боковые части тестовых пробирок, в противном случае лизис может быть неполным.
4. Осторожно перемешайте на вортексе. При использовании комплекта реагентов для лизиса цельной крови инкубируйте реактивные смеси при температуре 20-25°C в течение 45-47 минут.

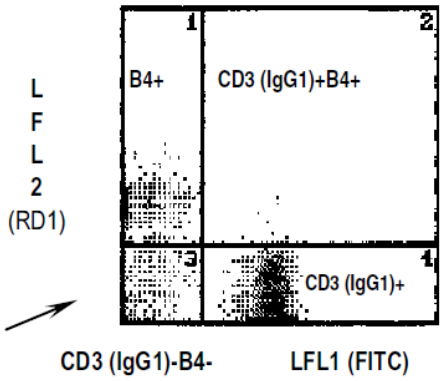
ВАЖНО: Капли крови, оставшиеся вокруг верхней части пробирки, необходимо удалить, так как в противном случае нелизированные эритроциты могут контаминировать конечную пробу и исказить результаты. Для удаления капель крови используйте аппликаторы с ватными наконечниками.

1. Лизируйте эритроциты в каждой тестовой пробирке, используя рекомендуемую процедуру для лизирующей методики в наборе реагентов для лизирования цельной крови.
5. Проанализируйте клетки на проточном цитометре с возможностью двухцветного флуоресцентного анализа, правильно стандартизованном и с выполненным гейтированием лимфоцитов в соответствии с руководством по эксплуатации прибора. Чтобы свести к минимуму возможность получения субоптимальных результатов, анализируйте окрашенные клетки без задержек.
   a. Значения флуоресценции проточной цитометрии необходимо регистрировать на логарифмической шкале.
   b. Световое рассеяние под прямым углом (FALS) можно регистрировать на линейной шкале. Световое рассеяние под углом 90° (90°LS) можно регистрировать на логарифмической или линейной шкале.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ

ОСТОРОЖНО: Если лазер проточного цитометра не настроен, или гейты настроены неверно, возможно получение ошибочных результатов.

1. Получите гистограмму зависимости SS (90°LS) от FALS. Достаточным является получение трехчастного дифференциала.
2. Получите логарифмическую гистограмму зеленой [LFL1 (FITC)] или оранжевой [LFL2 (RD1)] флуоресценции, гейтированную по 90°LS и гистограмму FALS, гейтированную по лимфоцитам. Процентные значения положительных популяций можно получить, определив отчетливый пик флуоресценции (один цвет) или настроив статистику по квадрантам (два цвета). Подробнее см. в руководстве по эксплуатации прибора.
3. На следующей гистограмме представлен пример анализа нормальной пробы на проточном цитометре COULTER EPICS с гейтированием по лимфоцитам. 98 ±1% клеток, неспецифически окрашенных с использованием изотипического контрольного реагента, были исключены путем установки квадрантов.
4. Процентное содержание положительно окрашенных клеток CD3+ [CD3 (IgG1)+] получено в квадранте 4. Процентное содержание положительно окрашенных клеток CD19+ (B4+) получено в квадранте 1. Процентное содержание клеток с двойным положительным окрашиванием CD3+/CD19+ [CD3 (IgG1)+/B4+] получено в квадранте 2.
5. Об использовании изотипических контрольных реагентов при анализе результатов проточной цитометрии см. в разделе ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.



АБСОЛЮТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для расчета абсолютных значений используется следующая формула:

Абсолютное значение [клеток/mm^3 (или клеток/µL)] = Общее число лейкоцитов [клеток/mm^3 (или клеток/µL)] x % лимфоцитов x % положительно окрашенных клеток/10^4

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для обеспечения правильной работы для получения положительных контрольных проб необходимо использовать обычных, практически здоровых доноров. Нормальные диапазоны следует устанавливать для местной популяции здоровых доноров.

Флуорохромы флуоресцин и фикоэритрин (RD1) испускают свет с разной длиной волны, однако их спектры частично перекрываются, поэтому необходима коррекция с помощью электронной компенсации. Оптимальные уровни компенсации могут быть получены при анализе двухпараметрической гистограммы донорских клеток, окрашенных каждым из флуорохромов по отдельности. При этом анализе выполняется регулировка для обеспечения отсутствия окрашивания в двухцветном квадранте (квадрант 2) с любым отдельным флуорохромом. Влияние специфичных и/или неспецифичных антител, связывающихся с моноцитами и гранулоцитами в пробе через Fc-фрагмент, можно исключить, выполнив правильное гейтирование лимфоцитов на проточном цитометре.

Чтобы правильно исключить из гейта моноциты, реагент моноклональных антител CD14/CD45, такой как CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56 (T-200)-FITC (Ч.№ 6603909 - 50 тестов) необходимо обрабатывать с каждой пробой для правильной оценки растрового изображения гейта.[25]

Изотипический контрольный реагент CYTO-STAT/ COULTER CLONE используется для исключения в каждой пробе влияния неспецифичных антител, связывающихся с лимфоцитами через Fc-фрагмент. Популяция положительно окрашенных лимфоцитов с яркой флуоресценцией измеряется в гейтах, настроенных на исключение низкого уровня неспецифической флуоресценции.

Неспецифическая флуоресценция (при использовании квадрантов для исключения 98 ±1% неспецифического окрашивания) у здоровых субъектов обычно составляет 2% или меньше. Повышенные значения могут определяться при некоторых злокачественных заболеваниях. Если фоновый уровень в квадрантах 1, 2 или 4 для любой контрольной пробы превышает 2%, то результаты теста могут быть ошибочными.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для получения оптимальных результатов пробы крови необходимо окрашивать в течение 6 часов после сбора. Перед окрашиванием или анализом выдержите пробы в пробирках для сбора крови при комнатной температуре. Не охлаждайте. При анализе длительно хранящихся или охлажденных проб возможно получение недостоверных результатов. Чтобы свести к минимуму возможность получения субоптимальных результатов, анализируйте окрашенные клетки без задержек.
2. Рекомендуемая жизнеспособность клеток для образцов венозной крови составляет 90%, однако, получение такого значения может быть затруднено для некоторых патологических образцов.
3. Длительное взаимодействие клеток с лизирующими реагентами может привести к разрушению лейкоцитов и потере клеток интересующей популяции.
4. Не все эритроциты могут лизироваться в следующих случаях: ядросодержащие эритроциты, патологическая концентрация белка, гемоглобинопатия. Это может привести к ложному снижению результатов, поскольку нелизированные эритроциты будут подсчитаны как лейкоциты.
5. Данный реагент предназначен для использования с препаратами цельной крови. Не рекомендуется использовать данный реагент с препаратами свежих или замороженных мононуклеарных клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Не разбавляйте, не используйте по частям и не замораживайте этот реагент. Используйте только в том виде, в котором они упакованы.
7. Данный реагент предназначен только для проточной цитометрии.
8. Патологические состояния организма не всегда сопровождаются патологическими изменениями процентного содержания популяций лейкоцитов. При патологических состояниях может отмечаться такое же процентное соотношение лейкоцитов, как у здорового человека. Используйте результаты теста в сочетании с клиническими и другими диагностическими данными.
9. У определенных пациентов изменение или выраженное снижение числа клеток определенных клеточных популяций может вызывать специфические нарушения.
10. У некоторых пациентов, получающих терапию OKT3, использование реагента моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1 может привести к получению недостоверных результатов.[26-28]
11. При проточной цитометрии возможно получение ошибочных результатов, если лазер не настроен или неправильно настроены гейты.
12. Ввиду значительных различий между разными лабораторными методами определения абсолютных значений лимфоцитов необходима оценка точности используемого метода.[29]

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Реагент моноклональных антител CYTO-STAT/ COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1

Пробы крови были взяты в популяции практически здоровых мужчин и женщин. Популяция была географически неоднородна и включала субъектов из восточных, юго-восточных, средне-западных, северо-западных и юто-западных штатов США, вне зависимости от расы и в возрасте 21-95 лет. Пробы окрашивались моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/ B4-RD1. Нормальные значения клеток CD3 (IgG1)+ и B4+, определенные методом проточной цитометрии (COULTER EPICS Profile, гейтирование по лимфоцитам) при анализе цельной крови, приведены в следующей таблице. Для каждой пробы было получено количество лейкоцитов и 3 популяции дифференцировки. Значения выражены в процентах (%) от общего количества лимфоцитов и в абсолютных значениях [клеток/mm^3 (или клеток/µL)]. Эти значения приведены только для справки. В каждой лаборатории необходимо определить собственные ожидаемые значения, используя местную популяцию здоровых доноров.

	ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ			
	Число	Мин.	Макс.	Среднее ±1 SD
% лимфоцитов CD3 (IgG1)+	159	34	87	71,3 ±8,2
% лимфоцитов B4+	159	2	26	12,0 ±4,5
Абсолютное значение CD3 (IgG1)+	159	513	3301	1425,5 ±472,8
Абсолютное значение B4+	159	31	802	243,4 ±126,7

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD3 специфичен для всей линии Т-клеток, в норме он присутствует на поверхности зрелых тимоцитов, а также незрелых и активированных Т-лимфоцитов периферической крови (как индуцирующей, так и супрессорной/цитотоксической популяции, а также на некотором количестве натуральных киллеров.[1,2,4,7,8] Он не определяется на В-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах и тромбоцитах.[2] Экспрессии антигена CD3 на поверхности клетки предшествует его появление в цитоплазме незрелых и промежуточных тимоцитов.[7]

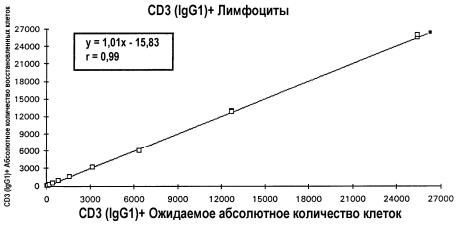
Антиген CD19 является ранним поверхностным антигеном, специфичным к линии В-клеток, в норме он присутствует, начиная с ранних стадий развития предшественников В-клеток до последней стадии дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки.[2,3,7,11] Он определяется более чем на 90% В-лимфоцитов, выделенных из периферической крови, селезенки, лимфатических узлов и миндалин, а также приблизительно на 5% клеток костного мозга.[3] В кроветворной системе этот антиген определяется только на нормальных и опухолевых В-клетках.[3] Антиген CD19 не определяется на Т-лимфоцитах периферической крови, моноцитах, гранулоцитах и тромбоцитах.[3,11]

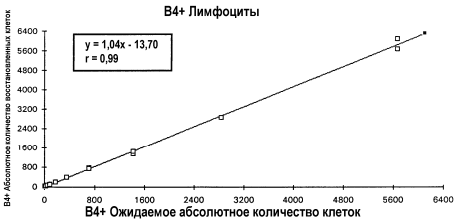
Для оценки клеточной перекрестной реактивности моноклональные антитела CYTO-STAT/ COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1 определялись в пробах крови здоровых взрослых доноров. Результаты убедительно продемонстрировали, что эти реагенты специфично реагируют с лимфоцитами и не реагируют с моноцитами и гранулоцитами.

Описание способов контроля специфического и неспецифического окрашивания моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1 см. в разделе ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Для оценки диапазона концентраций лимфоцитов CD3 (IgG1)+ и B4+ выполнено три повторных измерения каждого из девяти серийных разведений концентрированной пробы обычной крови. Клетки окрашивались моноклональными антителами CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/ B4-RD1 и анализировались методом проточной цитометрии.





КОРРЕЛЯЦИЯ

Лизированная цельная кровь здоровых доноров с моноклональными антителами COULTER CLONE CD3 (IgG1), CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC, COULTER CLONE B4, CYTO-STAT/ COULTER CLONE B4-RD1 и CYTO-STAT/ COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1 анализировалась методом проточной цитометрии (COULTER EPICS Profile, гейтирование по лимфоцитам). Полученные данные (см. таблицу ниже) подтвердили предположение об эквивалентной реактивности этих реагентов в отношении Т- и В-лимфоцитов периферической крови. Результаты выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

	ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ			
Реагент	Число	Мин.	Макс.	Среднее ±1 SD
CD3 (IgG1)	60	56	84	67,9 ±10,7
CD3 (IgG1)-FITC	159	33	88	71,5 ±8,6
CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1 [фракция CD3 (IgG1)-FITC]	159	34	87	71,3 ±8,2
B4	9	7	10	8,1 ±1,1
B4-RD1	159	1	26	11,4 ±4,3
CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1 [фракция B4-RD1]	159	2	26	12,0 ±4,5

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ИЗМЕРЕНИЙ

В течение дня

На проточном цитометре COULTER EPICS Profile для каждой из трех концентраций лимфоцитов CD3 (IgG1)+ и B4+ в течение одного дня выполнялось десять измерений. Для получения различных концентраций в пробах цельной крови выполнялось уменьшение числа клеток путем добавления магнитных частиц, связанных с моноклональными антителами. Клетки окрашивались реагентом моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1. Результаты выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

Концентрация	Число	Средний % CD3 (IgG1)+	±1 SD	%CV	Средний % B4+	±1 SD	%CV
1	10	11,0	0,6	5,5	12,2	0,3	2,5
2	10	46,3	0,6	1,3	24,1	0,5	2,1
3	10	59,5	0,5	0,8	42,0	0,7	1,7

Межлабораторные сличения

Исследования выполнялись в один и тот же день в трех разных лабораториях COULTER Immunology с использованием разных проточных цитометров COULTER. На одном приборе выполнялось десять повторных измерений. Для всех измерений использовалась одна проба крови от одного здорового донора. Проба крови разделялась на три части, каждая из которых окрашивалась реагентом моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1. Результаты выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

Лаборатория/ прибор	Число	Средний % CD3 (IgG1)+	±1 SD	%CV	Средний % B4+	±1 SD	%CV
1 (EPICS Profile I)	10	79,4	0,7	0,9	10,2	0,5	4,9
2 (EPICS Profile I)	10	81,0	0,6	0,7	9,6	0,3	3,1
3 (EPICS Profile II)	10	81,5	0,5	0,6	10,4	0,5	4,8

ИЗБРАННЫЕ ССЫЛКИ

1. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds: 1984. Leukocyte Typing. New York: Springer-Verlag. p. 28, 41-42,196.
2. McMichael AJ, ed: 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press. p. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 176, 199, 302-306, 308, 475.
3. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID: 1986. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag. Vol 2, p. 8, 15-20, 37.
4. Reinherz EL and Schlossman SF: 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19: 821-827.
5. Aiuta F, Cerottini J-C, Coombs RRA, Cooper M, Dickler HB, Froland S, Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig J, Preud'homme J-L, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegal FP, Stjernsward J, Terry WD and Wybran J: 1975. Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies (IUIS), Report - July 1974. Clin Immunol and Immunopathol 3: 584-597.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Foon KA and Todd RF: 1986. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68: 1-31.
7. Drexler HG, Gignac SM and Minowada J: 1988. Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Blut 57: 327-339.
8. Caligiuri M, Murray C, Buchwald D, Levine H, Cheney P, Peterson D, Komaroff AL and Ritz J:1987. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. J Immunol 139: 3306-3313.
9. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF: 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell 30: 735-743.
10. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL: 1983. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature 303: 808-810.
11. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF and Schlossman SF: 1983. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. J Immunol 131: 244-250.
12. Benjamini E and Leskowitz S: 1991. Disorders of the Immune Response. In: Immunology: A Short Course. Second Edition. New York: Wiley-Liss. p. 211-244.
13. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF: 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol 125: 1269-1274.
14. Felsenstein D, Carney WP, Iacoviello VR and Hirsch MS:1985. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152: 198-203.
15. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL: 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun 40: 472-477.
16. Goldstein G, Lifter J and Mittler R: 1982. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Fabre JW, eds. New York, NY: Academic Press. p. 39-70.
17. Schmidt RE: 1989. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. Blut 59: 200-206.
18. de Martini RM and Parker JW: 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3: 56-70.
19. Fauci AS: 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239: 617-622.
20. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV: 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2: 114-124.
21. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM: 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood 74: 2203-2211.
22. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, Van Leeuwen E, Capel PJA and Haanen C: 1989. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WTI-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood 74: 1152-1158.
23. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB: 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47: 465-471.
24. Beverly PCL and Callard RE: 1981. Distinctive functional characteristics of human 'T' lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cells antibody. Eur J Immunol 11: 329-334.
25. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA: 1990. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 11: 453-459.
26. Gebel HM, Lebeck LL, Jensik SC, Landay AL and Bray RA: 1989. Discordant expression of CD3 and T-cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated with OKT3. Transplantation Proceedings 1: 1745-1746.
27. Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissensen GW, Karjalainen K and De Le Hera A: 1989. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In Leukocyte Typing IV, White Cell Differentiation Angtigens. W Knapp et al., eds. Oxford: Oxford University Press. p. 295-296.
28. Schroeder TI and Chatenoud L. Immunological monitoring during treatment with OKT3. Presented under the auspices of the American Society of Transplant Surgeons. Citation to be filled in when available from authors.
29. Koepke JA and Landay AL: 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52: 19-27.

ДОСТУПНОСТЬ ПРОДУКТА

Моноклональные антитела CYTO-STAT/ COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/B4-RD1, REF 6605015 - 50 тестов (0,5 mL)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

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

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Редакция JC, 07/2013

Изменения были внесены в:

- ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT/COULTER CLONE
- РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ

Редакция JD, 12/2014

Изменения были внесены в:

- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Версия JE, 06/2016

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- Обновленный адрес представительства в ЕС
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Flow-Check Fluorospheres

Инструкции по применению

REF **6605359 - 3 x 10 mL**

Ч.№ 4276179-LJ

CE BECKMAN COULTER

Проверка оптического согласования проточного цитометра

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Флуоросферы Flow-Check Fluorospheres являются измеряемой суспензией флуоросфер (флуоресцирующих микросфер), используемых для ежедневной проверки оптического совмещения и системы обработки жидкостей проточного цитометра.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЕ

В проточном цитометрическом анализе оптическая и струйная система согласованы относительно оси оптического совмещения, чтобы максимально увеличить обнаружение флуоресценции и сигналов рассеяния. Использование однородных флуоросфер для проверки оптического согласования было хорошо обосновано.[1-3] Flow-Check Fluorospheres является суспензией флуоросфер с однородным и стабильным размером, и интенсивностью флуоресценции. Однородность этих параметров продукта принимается в расчет для настройки и/или проверки согласования оптической и струйной систем проточного цитометра.

РЕАГЕНТЫ

Flow-Check Fluorospheres
REF 6605359 - 3 x 10 mL

СОСТАВ РЕАГЕНТА

Реагент Flow-Check Fluorospheres состоит из полистироловых флуоросфер размером 10 µm (номинальный диаметр) во взвешенной водной среде, содержащей поверхностно-активные вещества и консерванты, с концентрацией 1 x 10^6 флуоросфер/mL (номинальная концентрация). Каждая флуоросфера содержит краситель, который имеет флуоресцентное излучение с длиной волны от 525 nm до 700 nm, при возбуждении при 488 nm.

Показания: не применимо.

Противопоказания: не применимо.

Побочные эффекты: не применимо.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

ВНИМАНИЕ
реакционная масса из 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-она [EC № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин-3-она [EC № 220-239-6](3:1) <0,05%
Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения/лица.
При появлении раздражения кожи или сыпи: обратиться за медицинской помощью.
Снять загрязненную одежду и постирать перед использованием.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs.***

1. Этот продукт должен быть использован только в его взвешенной среде. Добавление органических растворителей или растворов с высокой концентрацией ионов может вызвать необратимое разбухание или агрегацию флуоросфер.
2. Флуоросферы оседают при хранении в течение длительного периода. Перед использованием убедитесь, что флуоросферы полностью ресуспендированы.
3. Не используйте флуоросферы после истечения срока хранения, указанного на этикетке флакона.
4. Руководствуйтесь надлежащей лабораторной практикой (НЛП) при манипуляциях с этим реагентом.
5. Не аспирируйте флуоросферы непосредственно из флакона. Аспирируйте флуоросферы из пробирки.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Этот реагент стабилен до истечения указанного на этикетка флакона срока хранения, при хранении при 2-8°C. Не замораживать. Свести к минимуму воздействие света. Открытые флаконы после использования должны храниться охлажденными, и являются стабильными до истечения срока хранения, указанного на этикетке флакона.

ПРИЗНАК ПОРЧИ

Неспособность получить ожидаемые результаты может указывать на нестабильность или порчу продукта. Присутствие двухвершинного пика не является обязательным признаком порчи продукта. Обратитесь к соответствующим руководствам прибора, чтобы получить информацию о рабочих характеристиках и определении ожидаемых результатов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТА

Реагент не нуждается в приготовлении. Flow-Check Fluorospheres используется непосредственно из флакона, без разбавления. Перед использованием реагент необходимо тщательно перемешать.

ПРОЦЕДУРА

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Flow-Check Fluorospheres
REF 6605359 - 3 x 10 mL

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Пробирки необходимого размера

Проточный цитометр

Вихревой смеситель

Процедура для ежедневной проверки согласования и струйной системы

1. Используйте обычный набор фильтров, рекомендованный производителем для регистрации соответствующих параметров флуоресценции (смотрите руководства приборов).
2. Используйте протокол испытаний Flow-Check Fluorospheres, содержащий однопараметрические гистограммы для FS и каждого необходимого линейного параметра флуоресценции. С помощью гейтинга создайте на гистограмме FS область анализа. Присвойте область анализа линейным однопараметрическим гистограммам флуоресценции. Создайте линейный регион в каждой однопараметрической гистограмме. Установите цветовую компенсацию на ноль (0) процентов для всех компенсаций флуоресценции. Установите остановку на 5 000 гейтированных событий (смотрите рисунок 1).
3. Энергично перемешайте флакон с Flow-Check Fluorospheres, пока осадок на дне флакона не исчезнет.
4. Внесите 15-20 капель (около 0,5 mL) Flow-Check Fluorospheres в пробирку.

ВАЖНО: ЧТОБЫ ИЗБЕЖАТЬ ЗАГРЯЗНЕНИЯ И ПОРЧИ, НЕ АСПИРИРУЙТЕ НЕПОСРЕДСТВЕННО ИЗ ФЛАКОНА.

5. Перемешайте в вибромешалке Вортекс и аспирируйте образец флуоросфер из пробирки.
6. Отрегулируйте настройки соответствующего детектора должным образом, чтобы поместить каждый пик в утвержденном диапазоне положения пика.
7. Запишите HPCV и положение пика для каждого необходимого параметра.
8. Ежедневно записывайте показатели HPCV для каждого необходимого параметра на его соответствующем графике Levey-Jennings.

   ПРИМЕЧАНИЕ: При запуске протоколов BCI Auto Setup Flow-Check, критерий PASS/FAIL, наблюдающийся в конце регистрации, представляет показатели HPCV, превышающие обозначенный в названии области протокола верхний предел. Проверьте данные контроля качества (QC) Levey Jennings (смотрите рисунок 3).

9. После запуска прибора повторите этапы 1-8.
10. Когда результаты выходят за рамки ожидаемых ограничений, обратитесь к разделу о поиске и устранении неисправностей.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Анализируемый при повышенной скорости потока реагент Flow-Check Fluorospheres может показывать более широкое распределение совокупности и более высокие показатели HPCV.
2. Ежедневный анализ реагента Flow-Check Fluorospheres должен проводиться, используя положения пика, полученное в Процедуре для ежедневной проверки согласования и струйной системы.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

1. Убедитесь, что образец флуоросфер не был разбавлен или загрязнен. Разбавление Flow-Check Fluorospheres может привести к повышению извлеченных показателей HPCV.
2. Проверьте, что реагент Flow-Check Fluorospheres был тщательно перемешан таким образом, что осадок не наблюдается.
3. Проверьте, что крышка резервуара с кожухом не протекает.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Проверьте отсутствие пузырьков в фильтре резервуара с кожухом. Проверьте изображения гистограмм на наличие признака засорения. Если вы подозреваете наличие засорения или пузырька, промойте или заправьте линию проб.
5. Для дополнительных процедур по поиску и устранению неисправностей обратитесь к руководствам приборов.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Каждая лаборатория должна утвердить собственные ожидаемые диапазоны на основании используемого прибора, его настройки и условий эксплуатации. За информацией о рабочих характеристиках и получении ожидаемых результатов, обратитесь к соответствующим руководствам прибора. Для подсчета и определения размера частиц используется анализатор размеров частиц COULTER.

Для приборов Beckman Coulter каждая лаборатория должна проверить, что утвержденные диапазоны находятся в пределах рабочих характеристик, указанных в соответствующих руководствах прибора.

Ожидаемые результаты могут варьироваться вследствие отличий приборов таких как, цветовые фильтры, мощность лазера, длина волны лазерного излучения, режим лазера, тип проточной кюветы, скорость доставки пробы и программа статистической обработки данных.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.
2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо третьих лиц, либо непреодолимой силы.
3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер» 109004, г. Москва, ул. Станиславского, д.21, стр.3
Тел./факс, e-mail: (495) 9846730/(495) 228-67-00,
e-mail: beckman.ru@beckman.com

СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline. 1998. NCCLS document H42-A.
2. Guideline for Flow Cytometric Immunophenotyping: A Report From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. 1993. Cytometry 14:702-715.
3. 1994 Revised Guidelines for the Performance of CD4+ T-Cell Determinations in Persons with Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection.1994. Mortality and Morbidity Weekly Report (MMWR). 43:7-8.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Flow-Check Fluorospheres
REF 6605359 флакона - 3 x 10 mL

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

СВЕДЕНИЯ О ПЕРЕРАБОТКЕ И ИСПРАВЛЕНИИ ИЗДАНИЯ

Редакция LG, 09/2017

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Редакция LH, 07/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Редакция LJ, 10/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 1. Образцы гистограмм Flow-Check Fluorospheres.

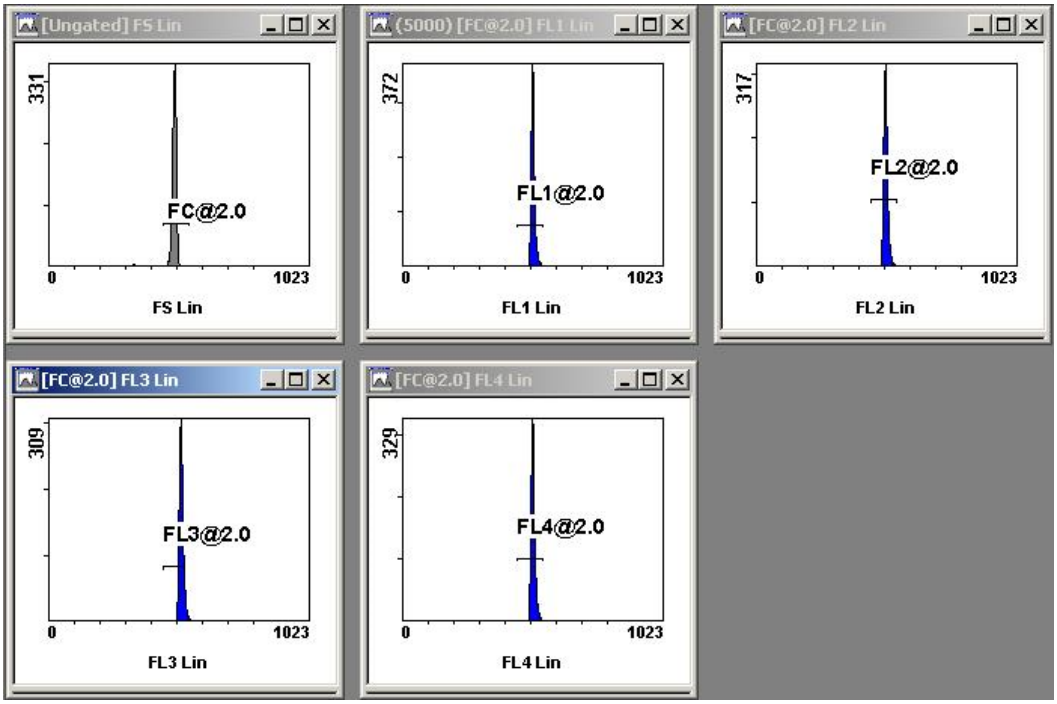


Рисунок 2. Пример графика Levey-Jennings для ежедневного нанесения показателей HPCV.

График Levey-Jennings для ежедневной проверки оптического согласования

Флуосферы Flow-Check Fluorospheres **Лот номер**

Срок годности

Временной период **Прибор**

Коэффициент вариации по полувысоте пика (HPCV): FS___ FL1___ FL2___ FL3___ FL4___

HPCV

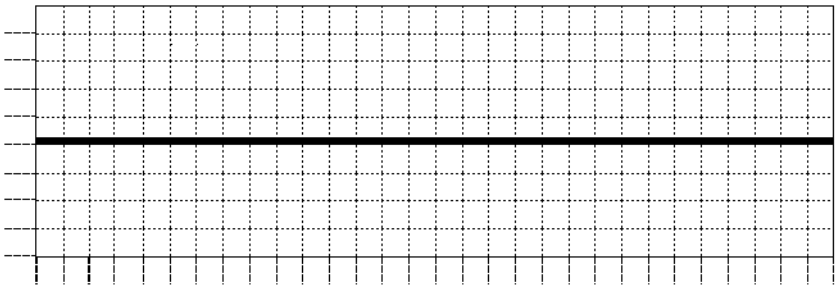


Рисунок 3. Пример таблицы для записи положения пика флуоросфер Flow-Check и HPCV для ежедневной проверки согласования и струйной системы.

Ежедневный журнал проверки оптического согласования
Флуосферы Flow-Check Fluorospheres

Лот номер
Срок годности
Прибор

	FS		FL1		FL2		FL3		FL4	
Run	Peak	HPCV	Peak	HPCV	Peak	HPCV	Peak	HPCV	Peak	HPCV
1										
2										
29										
30										

Flow-Set Fluorospheres

Инструкции по применению

REF **6607007 - 3 x 10 mL**

Ч.№ 4238027-LG

CE BECKMAN COULTER

Калибровочные частицы для стандартизации проточного цитометра

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Flow-Set Fluorospheres представляют собой суспензию калибровочных частиц (флуоресцентных микросфер), которые используются в качестве дополнительного средства оптимизации работы проточного цитометра при количественном анализе человеческих лейкоцитов.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

В проточном цитометрическом анализе размер клеток определяется в результате анализа характеристик рассеяния света, а иммунофенотипирование клеток выполняется с помощью специфических антител, связанных с флуоресцентными красителями. Поэтому, для обеспечения оптимальной ежедневной работы прибора важно, чтобы параметры рассеяния света и флуоресценции, получаемые проточным цитометром, были стандартизованы. Калибровочные частицы широко применяются для стандартизации интенсивности рассеяния света, интенсивности флуоресценции и получения оптимальной гидродинамической фокусировки.[1-3]

Стандартизацию прибора следует выполнять с теми же настройками детектора, что и при тестировании проб.[1] В каждой лаборатории следует установить оптимальные настройки приборов и оценить ежедневные значения.[1] Калибровочные частицы можно использовать для стандартизации трех типов параметров проточного цитометра: интенсивности рассеяния света, интенсивности флуоресценции и гидродинамической фокусировки. Эти параметры прибора можно стандартизировать, определив прямое рассеяние (FS), боковое рассеяние (SS или SS Log), интенсивность флуоресценции, а также полупиковый коэффициент вариации (HPCV) во время тестирования калибровочных частиц с использованием настроек прибора, специализированных для лаборатории и приложения. Измерение настроек прибора, необходимых для получения значений каждого из требуемых параметров калибровочных частиц, можно использовать при ежедневном мониторинге характеристик прибора.

принципы теста

Характеристики данного реагента зависят от возможности проточного цитометра определять размеры частиц и сигналы флуоресценции при разных длинах волн. Flow-Set Fluorospheres представляют собой суспензию частиц с одинаковым стабильным размером и одинаковой интенсивностью флуоресценции. Стабильность данных параметров продукта позволяет выполнять стандартизацию настроек прибора (рассеяние света и интенсивность флуоресценции), используемых при количественном анализе человеческих лейкоцитов.

РЕАГЕНТЫ

Flow-Set Fluorospheres
REF 6607007 - 3 x 10 mL флаконы

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Flow-Set Fluorospheres представляют собой полистирольные частицы с номинальным диаметром 3,6 µm, взвешенные в водном растворе с сурфактантами и консервантами, в номинальной концентрации 1 x 10^6 частиц/mL. Диапазон флуоресценции раствора калибровочных частиц составляет от 525 nm до 700 nm, при возбуждении волной в 488 nm.

Показания: не применимо.

Противопоказания: не применимо.

Побочные эффекты: не применимо.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

ВНИМАНИЕ

реакционная масса из 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-она [EC № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин-3-она [EC № 220-239-6](3:1) <0,05%
Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения/лица.
При появлении раздражения кожи или сыпи: обратиться за медицинской помощью.
Снять загрязненную одежду и постирать перед использованием.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs.***

1. Этот продукт необходимо использовать только в форме суспензии. Добавление органических растворителей или растворов с высокой ионной силой может привести к необратимому увеличению размера калибровочных частиц или их агрегации.
2. Калибровочные частицы медленно оседают на дно. Перед использованием убедитесь, что калибровочные частицы полностью возвращены в состояние суспензии.
3. Во время хранения не подвергайте калибровочные частицы воздействию яркого света.
4. Не используйте калибровочные частицы после истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. Не аспирируйте калибровочные частицы непосредственно из флакона. Аспирируйте калибровочные частицы из тестовой пробирки.
6. При работе с этим реагентом следуйте принципам надлежащей лабораторной практики (GLP).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Этот реагент стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при темературе 2-8°C. Не замораживайте. Сведите к минимуму воздействие света. Вскрытый флакон стабилен в течение 65 дней. Вскрытые флаконы после использования необходимо охлаждать. Калибровочные частицы, добавляемые в тестовые пробирки, необходимо утилизировать после использования в течение дня.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Появление вторичных флуоресцентных популяций, содержащих более 20% от общей популяции может указывать на разрушение; в этом случае продукт использовать нельзя.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием Flow-Set Fluorospheres необходимо тщательно перемешать. Тестовые пробирки с пробами, которые стояли длительное время, перед использованием необходимо перемешать на вихревом смесителе. Другие действия не нужны.

ПРОЦЕДУРА

ПОСТАВЛЯЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Flow-Set Fluorospheres
REF 6607007 - 3 x 10 mL флаконы

МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ

Тестовые пробирки соответствующего размера

Проточный цитометр

Вихревой смеситель

В таблице ниже обобщены процедуры для трех типичных способов стандартизации прибора.

Таблица сводных данных по процедурам

ПРИМЕЧАНИЕ: Порядок действий обозначен цифрами.

Процедура	Действие		
	Протокол стандартизации не используется	Используется установленная процедура (только для параметров флуоресценции)*	Сравнение партий
Установка диапазонов флуоресценции и/или рассеяния света	✓①	✓①	
Установка диапазонов высокого напряжения/ общего усиления прибора	✓②	✓②	
Ежедневная стандартизация прибора	✓③	✓③	✓②
Проверка при изменении партии	✓④	✓④	✓①

*Если необходимо добавить стандартизацию рассеяния света к текущим установленным в лаборатории процедурам стандартизации флуоресценции.

Процедура установки диапазонов флуоресценции и/или рассеяния света

ПРИМЕЧАНИЕ: Используйте эту процедуру для: (а) оценки целевых диапазонов параметров флуоресценции и рассеяния света, если проточный цитометр или приложение реагента не стандартизованы, (б) добавления стандартизации рассеяния света к текущей установленной в лаборатории процедуре стандартизации флуоресценции или (в) добавления настройки селекции CD45 к текущей установленной в лаборатории процедуре стандартизации флуоресценции. При использовании tetraONE, tetraCXP, stemONE, stemCXP, FlowCARE PLG или LeukoSure Enumeration Kit инструкции см. в Процедуре таблице целевых приложений Flow-Set Fluorospheres.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Диапазоны высокого напряжения и усиления для текущего контроля работы прибора получены при анализе флуоросфер Flow-Set Fluorospheres в разные промежутки времени после нагревания и юстировки прибора на протяжении как минимум 5 дней с целью получения 20 точек данных. Спецификации диапазонов высокого напряжения и усиления, и **специальные примечания для проверки данных контроля качества параметров светорассеяния приведены** на этапе 12: фактическое (общее) усиление.

1. Убедитесь, что проточный цитометр оптимально выровнен.
2. Для определения параметров флуоресценции, которые требуется анализировать, используйте фильтры, рекомендованные изготовителем (см. руководства по эксплуатации прибора или вкладыш в упаковке реагента).
3.
   a. **Для диапазонов флуоресценции и рассеяния света:**
   Используя соответствующий протокол теста, обработайте пробу, окрашенную с использованием изотипических контрольных клеток, и отрегулируйте параметры высокого напряжения и усиления для прямого рассеяния (FS) и бокового рассеяния (SS или SS Log), чтобы оптимизировать разрешение всех кластеров лейкоцитов. Установите высокое напряжение (ВН) логарифма флуоресценции в положение отрицательной флуоресценции в конце первого десятка. Запишите настройки прибора для параметров FS, SS и флуоресценции (см. Рисунок 1). При использовании программного обеспечения SYSTEM II и автоматической стандартизации запишите общие значения усиления для FS и SS.
   b. **Только для диапазонов рассеяния света:**
   Используя соответствующий протокол теста, обработайте лизированную пробу и отрегулируйте параметры высокого напряжения и усиления для прямого рассеяния (FS) и бокового рассеяния (SS), чтобы оптимизировать разрешение всех кластеров лейкоцитов. Запишите настройки прибора для параметров FS и SS (см. Рисунок 1). Также необходимо записать текущие значения для высокого напряжения флуоресценции, установленные в лаборатории. При использовании программного обеспечения SYSTEM II и автоматической стандартизации запишите общие значения усиления для FS и SS.
   c. **Для настройки селекции CD45:**
   Используя соответствующий протокол теста, обработайте пробу, окрашенную реагентом моноклональных антител, содержащим CD45. Отрегулируйте параметры высокого напряжения и усиления бокового рассеяния (SS) и флуоресценции CD45, чтобы оптимизировать разрешение всех кластеров лейкоцитов. Запишите настройки прибора для SS и CD45 (см. Рисунок 1). Также необходимо записать текущие значения для высокого напряжения флуоресценции, установленные в лаборатории. При использовании программного обеспечения SYSTEM II и автоматической стандартизации запишите общие значения усиления для SS.
4. Создайте для калибровочных частиц протокол в виде однопараметрических гистограмм для каждого требуемого параметра рассеяния света и логарифма флуоресценции. Назначьте область гистограммы FS в качестве селектора для гистограмм SS и логарифма флуоресценции. Создайте линейную область (курсор) в каждой гистограмме (см. Рисунок 2). Введите настройки прибора, определенные в шаге 3 выше и обозначенные на рисунке 1. Установите цветовую компенсацию на 0% для всех параметров флуоресценции. Установите для параметра флуоресценции значение остановки на 10 000 событий.
   ПРИМЕЧАНИЕ: Если при выполнении трехцветного анализа на проточном цитометре возможно отображение только четырех гистограмм, замените однопараметрические гистограммы FS и SS на двухпараметрическую гистограмму зависимости SS от FS. Создайте бесформенный селектор (A) и прямоугольную область (B) вокруг основных популяций на гистограмме зависимости SS от FS. Назначьте бесформенный селектор для гистограмм с логарифмом флуоресценции (см. Рисунок 3).
5. Энергично перемешайте флакон с калибровочными частицами Flow-Set до исчезновения осадка на дне флакона.
6. Добавьте в тестовую пробирку 15 - 20 капель (около 0,5 mL) Flow-Set Fluorospheres.

ВАЖНО: ВО ИЗБЕЖАНИЕ КОНТАМИНАЦИИ И РАЗЛОЖЕНИЯ НЕ ПРОИЗВОДИТЕ АСПИРАЦИЮ НЕПОСРЕДСТВЕННО ИЗ ФЛАКОНА. АСПИРИРУЙТЕ ИЗ ТЕСТОВОЙ ПРОБИРКИ.

7. Перемешайте на вихревом смесителе и аспирируйте пробу с калибровочными частицами.
8. Если необходимо, отрегулируйте область FS (или бесформенный селектор) таким образом, чтобы внутри области оказалась основная популяция калибровочных частиц. Если необходимо, отрегулируйте дискриминатор FS до уровня, при котором отображается основная популяция FS. Убедитесь, что курсор расположен напротив пиков популяций для всех требуемых параметров.
9. Запишите значения интенсивности пиков всех требуемых параметров (см. Рисунок 1).

   ПРИМЕЧАНИЕ: Когда на приборе невозможно быстро получить значение пиковой интенсивности, можно использовать средние значения интенсивности, если положение селекторов и областей остается постоянным день ото дня.

10. После того, как было получено и записано соответствующее число репрезентативных проб, рассчитайте и запишите средние пиковые интенсивности и определите целевые диапазоны для каждого требуемого параметра в соответствии с таблицей, приведенной на шаге 11.
11. Определите целевые диапазоны для требуемых параметров (см. руководство по эксплуатации прибора).

При использовании программного обеспечения SYSTEM II целевые диапазоны для требуемых параметров определяются следующим образом.

Параметр (Пиковая интенсивность)	Целевой диапазон* (± число каналов)
FS	Среднее ±2
SS	Среднее ±5
FL LOG (1-9.9)	Среднее ±0,1
FL LOG (10-99)	Среднее ±1
FL LOG (100-1024)	Определяется пользователем

* Среднее представляет собой среднее значение пиковой интенсивности репрезентативных проб.

12. Повторяйте шаги с 1 по 11 для каждого метода приготовления проб, для каждого нового приложения, требующего изменения настроек прибора, и каждый раз при значительных изменениях сигналов рассеяния или флуоресценции (замена трубки фотоумножителя, совмещение лазера и т.д.).
13. После установки целевых диапазонов для параметров флуоресценции и рассеяния света выполните процедуру установки диапазонов высокого напряжения (ВН)/общего усиления.

ПРОЦЕДУРА ТАБЛИЦЫ ЦЕЛЕВЫХ ПРИЛОЖЕНИЙ FLOW-SET FLUOROSPHERES

FC 500 с программным обеспечением CXP

1. Из папки Acquisition Protocol выберите и откройте протокол автоматической стандартизации.
2. При помощи меню Свойства области настройте Верхний и Нижний предел каждой целевой области на графике, согласно Таблице целевых значений приложения.

ПРИМЕЧАНИЕ: Благодаря эффекту округления на логарифмической шкале, пределы области, вводимые на логарифмической шкале, не могут храиться в том виде, в котором вводились.

3. Сохраните протокол с новыми изменениями.
4. Повторите процесс для указанных используемых проколов **AutoSetup *_STAND.pro**.

ПРИМЕЧАНИЕ: У протокола **AS stemCXP_STAND** необходимо будет снять аттрибут «Только для чтения» (в Файл>Свойства в Проводнике Windows), чтобы измененя протокола записались. Дополнительную информацию по редактированию области см. в CXP Online Help.

Для XL/XL-MCL с программным обеспечением SYSTEM II:

1. Выберите и запустите протокол Flow-Set для Панели Автонастройки tetraONE CS3D TBNK.
2. Запустите для приложения Flow-Set tube.
3. Нажмите кнопку ПАУЗА.
4. Запустите команду РЕГИОН -> ПРАВКА.
5. На каждом графике измените маленькую целевую область.
6. Введите значения нижнего и верхнего канала целевой области в Таблице целевых настроек приложения.
7. Сохраните протокол и перезапустите сбор.
8. Повторите процесс для указанных используемых проколов **_Axyz AutoSetup**.

Процедура установки диапазонов высокого напряжения (ВН)/общего усиления

ПРИМЕЧАНИЕ: Используйте эту процедуру после установки целевых диапазонов параметров флуоресценции и рассеяния света.

1. Убедитесь, что проточный цитометр оптимально выровнен.
2. Для определения параметров флуоресценции, которые требуется анализировать, используйте фильтры, рекомендованные изготовителем (см. руководства по эксплуатации прибора или вкладыш в упаковке реагента).
3. Выберите протокол анализа Flow-Set Fluorospheres (см. шаг 4 процедуры установки диапазонов флуоресценции и/или рассеяния света).
4. Энергично перемешайте флакон с калибровочными частицами Flow-Set до исчезновения осадка на дне флакона.
5. Добавьте в тестовую пробирку 15 - 20 капель (около 0,5 mL) Flow-Set Fluorospheres.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВАЖНО: ВО ИЗБЕЖАНИЕ КОНТАМИНАЦИИ И РАЗЛОЖЕНИЯ НЕ ПРОИЗВОДИТЕ АСПИРАЦИЮ НЕПОСРЕДСТВЕННО ИЗ ФЛАКОНА. АСПИРИРУЙТЕ ИЗ ТЕСТОВОЙ ПРОБИРКИ.

6. Перемешайте на вихревом смесителе и аспирируйте пробу с калибровочными частицами.
7. Если необходимо, отрегулируйте область FS (или бесформенный селектор) таким образом, чтобы внутри области оказалась основная популяция калибровочных частиц. Если необходимо, отрегулируйте дискриминатор FS до уровня, при котором отображается основная популяция FS. Убедитесь, что курсор расположен напротив пиков популяций для всех требуемых параметров.
8. Настройте прибор таким образом, чтобы каждый пик калибровочных частиц находился в целевом диапазоне, определенном в качестве номинального диапазона лаборатории (см. процедуру установки диапазонов флуоресценции и/или рассеяния света).
9. Запишите значения пиковой (или средней) интенсивности и высокого напряжения (ВН) для каждого параметра, а также значения усиления для рассеяния света (см. Рисунок 4). При использовании программного обеспечения SYSTEM II и автоматической стандартизации запишите общие значения усиления для FS и SS.
10. Продолжите обработку Flow-Set Fluorospheres, используя протокол Flow-Set до получения 20 точек данных. Получите данные в разные промежутки времени после нагревания и выравнивания прибора на протяжении как минимум 5 дней (убедитесь, что настройки записаны, как указано в шаге 9). После получения и записи 20 точек данных рассчитайте и запишите диапазон среднее ±2 SD или ±1% (в зависимости от того, что больше) для ВН/общего усиления каждого параметра.
11. Используйте диапазон среднее ±2 SD или ±1% для создания графика Леви-Дженнингса для каждого требуемого параметра (см. Рисунок 5).
12. Для каждого параметра 95% значений должны попасть в диапазон среднее ±2 SD или ±1% (в зависимости от того, что больше) диапазонов ВН/общего усиления.
13. После установки на приборе диапазонов ВН/общего усиления выполните процедуру ежедневной стандартизации прибора.

Процедура ежедневной стандартизации прибора

1. Убедитесь, что проточный цитометр оптимально выровнен.
2. Для определения параметров флуоресценции, которые требуется анализировать, используйте фильтры, рекомендованные изготовителем (см. руководства по эксплуатации прибора или вкладыш в упаковке реагента).
3. Выберите протокол анализа Flow-Set Fluorospheres (см. шаг 4 процедуры установки диапазонов флуоресценции и/или рассеяния света).
4. Энергично перемешайте флакон с калибровочными частицами Flow-Set до исчезновения осадка на дне флакона.
5. Добавьте в тестовую пробирку 15 - 20 капель (около 0,5 mL) Flow-Set Fluorospheres.

ВАЖНО: ВО ИЗБЕЖАНИЕ КОНТАМИНАЦИИ И РАЗЛОЖЕНИЯ НЕ ПРОИЗВОДИТЕ АСПИРАЦИЮ НЕПОСРЕДСТВЕННО ИЗ ФЛАКОНА. АСПИРИРУЙТЕ ИЗ ТЕСТОВОЙ ПРОБИРКИ.

6. Перемешайте на вихревом смесителе и аспирируйте пробу с калибровочными частицами.
7. Настройте прибор таким образом, чтобы каждый пик калибровочных частиц находился в целевом диапазоне, определенном в качестве номинального диапазона лаборатории (см. процедуру установки диапазонов флуоресценции и/или рассеяния света).
8. Запишите значения пиковой (средней) интенсивности и высокого напряжения (ВН) для каждого параметра, а также значения усиления рассеяния света в оперативный журнал (см. Рисунок 6). При использовании программного обеспечения SYSTEM II и автоматической стандартизации запишите общие значения усиления для FS и SS.
9. Отметьте значения ВН и усиления/общего усиления для каждого требуемого параметра на соответствующем графике Леви-Дженнингса (см. Рисунок 5). Если инструменты на используют программное обеспечение System II, см. Специальные примечания для проверки данных контроля качества параметров светорассеяния.
10. Для каждого параметра 95% значений должны попасть в диапазон среднее ±2 SD или ±1% (в зависимости от того, что больше) диапазона ВН или усиления/общего усиления для каждого параметра. Если значения выходят за границы диапазона, см. раздел УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ.
11. Ежедневно повторяйте шаги с 1 по10.

Специальные примечания для проверки данных контроля качества параметров светорассеяния: Фактическое (общее) усиление

FC 500 Проточный цитометр: Усиление сигналов прямого рассеяния (FS) и бокового рассеяния (SS) контролируется посредством настройки фактического (общего) усиления. Общее усиление является суммой вспомогательного усиления (напряжение) и линейного усиления (усиление).

- Автоматическая настройка позволяет оптимизировать напряжение и усиление линейных параметров, обеспечивая самый низкий уровень системного шума. Иногда система может отрегулировать усиление, исходя из настройки по одной точке данных, что приведет к более низкому соответствующему снижению напряжения в заданном целевом диапазоне каналов. И наоборот, система может понизить усиление и увеличить напряжение для одного и того же целевого диапазона в различных точках данных.
- Понимание взаимосвязи между напряжением и усилением для общего усиления является важным фактором в оценке данных контроля качества линейных параметров. Оценку данных контроля качества напряжения и усиления необходимо проводить одновременно. Общее усиление линейных параметров можно подсчитать вручную при помощи следующей формулы:

Фактическое (общее) усиление = усиление x [1 + (0,003 x ВН)]

Общее усиление можно отметить на графике Леви-Дженнингса вместо напряжения.

Процедура проверки при изменении партии

ПРИМЕЧАНИЕ: Используйте эту процедуру при изменении партии Flow-Set Fluorospheres. Параллельно обработайте старую и новую партии в соответствии с принятыми в лаборатории процедурами, чтобы определить средние значения и целевые диапазоны для новой партии.

1. Убедитесь, что проточный цитометр оптимально выровнен.
2. Для определения параметров флуоресценции и рассеяния, которые требуется анализировать, используйте фильтры, рекомендованные изготовителем (см. руководства по эксплуатации прибора или вкладыш в упаковке реагента).
3. Выберите текущий протокол стандартизации, используемый в лаборатории. Используя текущую партию Flow-Set Fluorospheres, выполните процедуру ежедневной стандартизации. Запишите значения пиковой (средней) интенсивности и высокого напряжения (ВН) для каждого параметра, а также значения усиления рассеяния света в текущий ежедневный журнал лаборатории.
4. Энергично перемешайте флакон с калибровочными частицами Flow-Set из новой партии до исчезновения осадка на дне флакона.
5. Добавьте в тестовую пробирку 15 - 20 капель (около 0,5 mL) Flow-Set Fluorospheres из новой партии.

ВАЖНО: ВО ИЗБЕЖАНИЕ КОНТАМИНАЦИИ И РАЗЛОЖЕНИЯ НЕ ПРОИЗВОДИТЕ НЕПОСРЕДСТВЕННО ИЗ ФЛАКОНА. АСПИРИРУЙТЕ ИЗ ТЕСТОВОЙ ПРОБИРКИ.

6. Перемешайте на вихревом смесителе и аспирируйте пробу с калибровочными частицами.
7.
   a. **Для протоколов с неавтоматической стандартизацией:** Обработайте Flow-Set Fluorospheres из новой партии с теми же настройками, как в шаге 3 выше. Убедитесь, что курсор расположен рядом с пиками популяций для всех требуемых параметров.
   b. **Для протоколов с автоматической стандартизацией:** Создайте копию текущего протокола стандартизации. Если используется программное обеспечение SYSTEM II, то в копии не должно быть символов подчеркивания (например, _AXYZ Flow-Set заменяется на AXYZ Flow-Set). Используя новый протокол, обработайте Flow-Set Fluorospheres из новой партии с теми же настройками, как в шаге 3 выше. Убедитесь, что курсор расположен рядом с пиками популяций для всех требуемых параметров. Для всех других систем проточной цитометрии см. руководства по эксплуатации приборов.
8. Запишите пиковую (среднюю) интенсивность всех требуемых параметров (см. Рисунок 4).

   ПРИМЕЧАНИЕ: Когда на приборе невозможно быстро получить значение пиковой интенсивности, можно использовать средние значения интенсивности, если положение селекторов и областей остается постоянным день ото дня.

9. После того, как было получено и записано соответствующее число повторов, рассчитайте и запишите средние пиковые интенсивности и определите целевые диапазоны для каждого параметра в соответствии с таблицей в шаге 10.
10. Определите целевые диапазоны для требуемых параметров (см. руководство по эксплуатации прибора).

При использовании программного обеспечения SYSTEM II целевые диапазоны для требуемых параметров определяются следующим образом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Параметр (Пиковая интенсивность)	Целевой диапазон* (± число каналов)
FS	Среднее ±2
SS	Среднее ±5
FL LOG (1-9.9)	Среднее ±0,1
FL LOG (10-99)	Среднее ±1
FL LOG (100-1024)	Определяется пользователем

* Среднее представляет собой среднее значение пиковой интенсивности репрезентативных проб.

11. Перенесите новые целевые каналы в протокол Flow-Set Fluorospheres:

    a. **Для протоколов с неавтоматической стандартизацией:**
    Если необходимо, отрегулируйте положение курсора на пике популяции, чтобы оно соответствовало новым целевым каналам.

    b. **Для протоколов с автоматической стандартизацией:**
    Если необходимо, в оригинальном протоколе Flow-Set отредактируйте маленькие целевые области, чтобы они соответствовали новым целевым каналам. В результате этого новые целевые каналы используются в файле настроек автоматической стандартизации. Подробнее см. в руководстве по эксплуатации прибора.

12. Используйте новые целевые диапазоны при выполнении процедуры ежедневной стандартизации прибора.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Настройки прибора необходимо изменять в зависимости от способа приготовления пробы. Flow-Set Fluorospheres могут быть не применимы для некоторых способов приготовления проб. В каждой лаборатории следует устанавливать собственные номинальные диапазоны для каждого прибора, каждого способа приготовления пробы и каждого флуоресцентного красителя.
2. При оседании калибровочных частиц в линиях проб проточного цитометра возможно получение противоречивых результатов.
3. Если используется программное обеспечение SYSTEM II и автоматическая стандартизация, запишите общее усиление FS и SS вместо усиления.

УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

1. Убедитесь, что проба не разбавлена и не контаминирована.
2. Убедитесь, что Flow-Set Fluorospheres хорошо перемешаны и отсутствует осадок.
3. Убедитесь, что крышка резервуара фокусирующей жидкости плотно закрыта и не протекает.
4. Проверьте, нет ли повышенного количества пузырьков в фильтре фокусирующей жидкости. При наличии засорения или пузырьков промойте или заполните линию пробы.
5. Подробнее о действиях по устранению неисправностей см. в руководстве по эксплуатации прибора.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.
2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо третьих лиц, либо непреодолимой силы.
3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер» 109004, г. Москва, ул. Станиславского, д.21, стр.3
Тел./факс, e-mail: (495) 9846730/(495) 228-67-00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

ССЫЛКИ

1. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline. CLSI Document H42-A2.
2. Guideline for flow cytometric immunophenotyping: A report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. 1993. Cytometry, 14:702-715.
3. 1997 Revised guidelines for performing CD4+ T-Cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV). January 10, 1997. MMWR, 46:12-13.

ДОСТУПНОСТЬ ПРОДУКТА

Flow-Set Fluorospheres
REF 6607007 - 3 x 10 mL флаконы

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Версия LE, 06/2016

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- Обновленный адрес представительства в ЕС

Версия LF, 07/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- АРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Версия LG, 10/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 1. Пример таблицы для записи интенсивности пиков Flow-Set Fluorospheres, высокого напряжения и усиления/общего усиления при установке целевых диапазонов флуоресценции и/или светового рассеяния.

Establishing Fluorescence and/or Light Scatter Target Ranges

Flow-Set Fluorospheres — Lot Number / Expiration Date

Application — Instrument

	FS			SS			FL1		FL2		FL3		FL4		
Run	Peak	HV*	Gain/ Total Gain**	Peak	HV	Gain/ Total Gain**	Peak	HV	Peak	HV	Peak	HV	Peak	HV	Oper/ Date
1															
2															
3															
n															
Average Channel															

*FS parameter HV adjustment not available on some flow cytometers.
** Record total gain if using SYSTEM II Software and autostandardization.

Рисунок 2. Пример протокола прибора при использовании Flow-Set Fluorospheres во время стандартизации проточного цитометра для четырехцветного анализа.

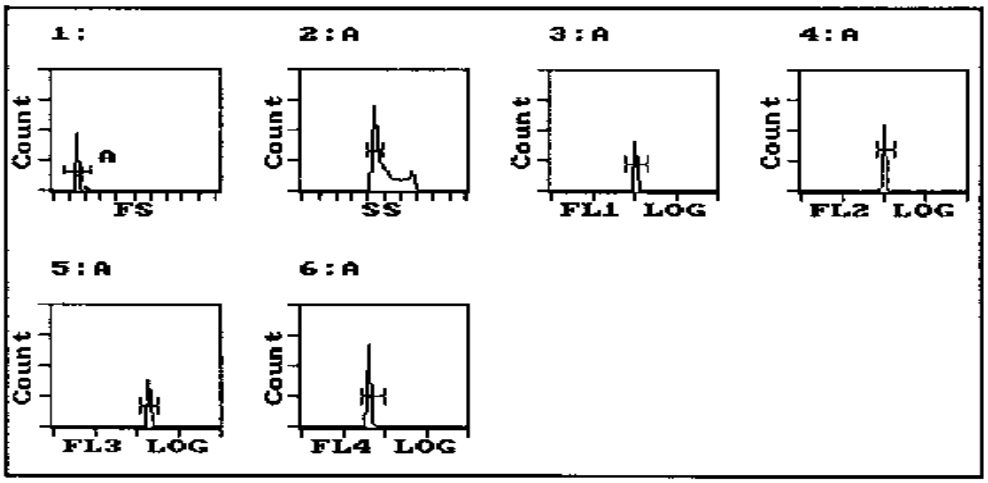
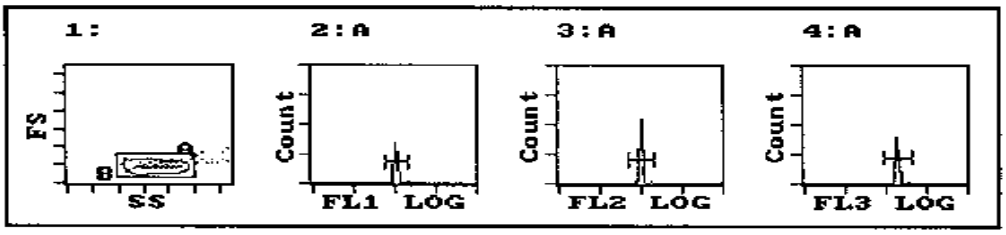


Рисунок 3. Пример протокола прибора при использовании Flow-Set Fluorospheres во время стандартизации проточного цитометра для трехцветного анализа на цитометре, на котором возможно отображение только четырех гистограмм.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 4. Пример таблицы для записи интенсивности пиков Flow-Set Fluorospheres, высокого напряжения и усиления/общего усиления при установке диапазонов высокого напряжения/общего усиления.

Establishing HV/Total Gain

Flow-Set Fluorospheres — Lot Number / Expiration Date

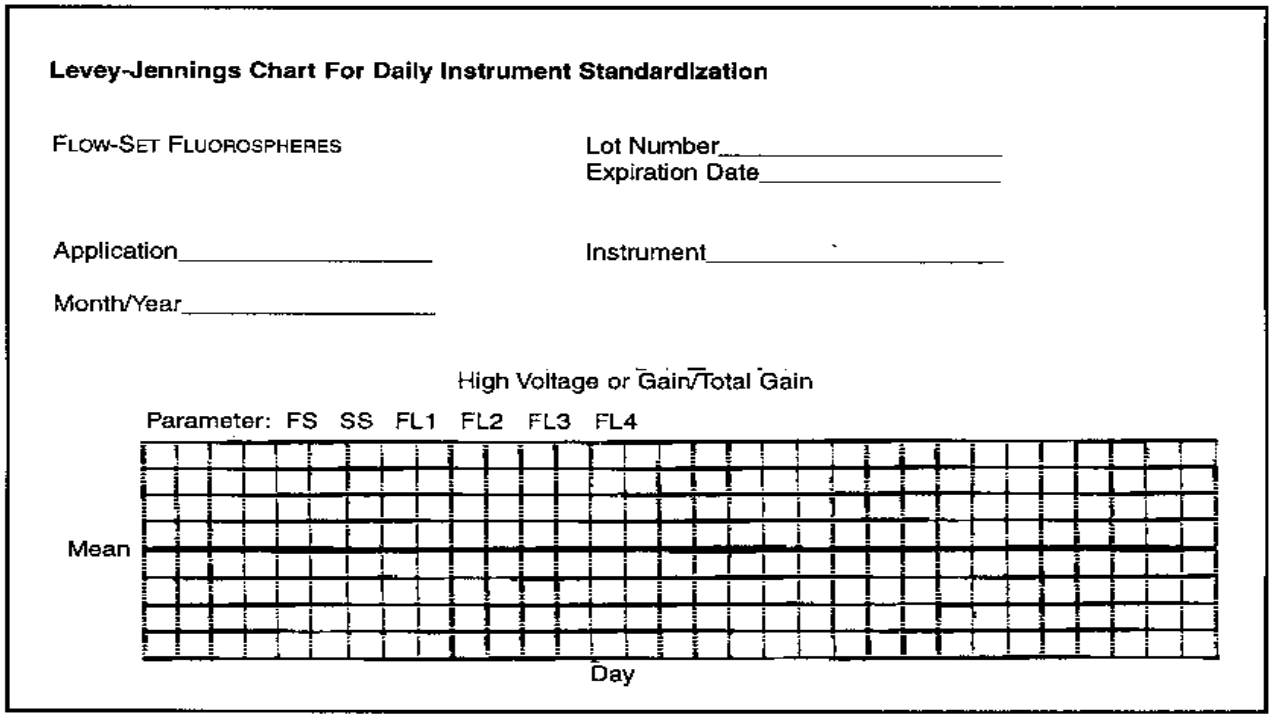
Application — Instrument

Peak Intensity Target Ranges*:
FS FL1 FL3
SS FL2 FL4

	FS			SS			FL1		FL2		FL3		FL4		
Run	Peak	HV**	Gain/ Total Gain†	Peak	HV	Gain/ Total Gain†	Peak	HV	Peak	HV	Peak	HV	Peak	HV	Oper/ Date
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
Average HV/Gain															
Average +2SD or +1%															
Average -2SD or -1%															

* See step 11, Procedure For Establishing Fluorescence And/Or Light Scatter Target Ranges.
** FS parameter HV adjustment not available on some flow cytometers.
† Record total gain if using SYSTEM II Software and autostandardization.

Рисунок 5. Пример графика Леви-Дженнингса



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 6. Пример ежедневной записи интенсивности пика Flow-Set Fluorospheres и настроек высокого напряжения и усиления/общего усиления.

Daily Log For Instrument Standardization

Flow-Set Fluorospheres — Lot Number / Expiration Date

Application — Instrument

Instrument HV/Total Gain Target Ranges*:

FS	FL1	FL3
SS	FL2	FL4

Run	FS			SS			FL1		FL2		FL3		FL4		Oper/ Date
	Peak	HV**	Gain/ Total Gain†	Peak	HV	Gain/ Total Gain†	Peak	HV	Peak	HV	Peak	HV	Peak	HV	
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
21															
22															
23															
24															
25															
26															
27															
28															
29															
30															

*See step 10, Procedure For Establishing Instrument HV/Total Gain Ranges.
**FS parameter HV adjustment not available on some flow cytometers.
† Record total gains if using SYSTEM II Software and autostandardization.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

REF 6607013 — 50 тестов

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

REF 6607073 — 50 тестов

Номер по каталогу B90108-AD

CE BECKMAN COULTER

	CD45-FITC	CD4-RD1	CD8-ECD	CD3-PC5	CD56-RD1	CD19-ECD
Специфичность	CD45	CD4	CD8	CD3	CD56	CD19
Клон	B3821F4A	SFCI12T4D11	SFCI21Thy2D3	UCHT1	N901/NKH-1	J3-119
Гибридома	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c
Иммуноген	Трансфектант, содержащий кДНК человеческого CD45	Человеческие периферийные Т-лимфоциты	Человеческие тимоциты	Человеческие тимоциты и лимфоциты периферической крови от пациента с лейкемией Сезари	Человеческие клетки хронической миелоидной лейкемии	Клетки лимфомы SKLY 18
Цепь Ig	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Виды	Мышь	Мышь	Мышь	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость	Кондиционированная среда	Кондиционированная среда	Кондиционированная среда	Асцитическая жидкость	Кондиционированная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 468–509 нм Излучение при 504–541 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 568–590 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 610–635 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 660–680 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 568–590 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 610–635 нм
Конъюгация	FITC (флуоресцеин изотиоцианат)	RD1 (фикоэритрин)	ECD (фикоэритрин-Texas Red-X)	PC5 (фикоэритрин-Cy5)	RD1 (фикоэритрин)	ECD (фикоэритрин-Texas Red-X)
Молярное отношение	FITC/белок: 3–10	RD1/белок: 0,5–1,5	ECD/белок: 0,5–1,5	PC5/белок: 0,5–1,5	RD1/белок: 0,5–1,5	ECD/белок: 0,5–1,5

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/ CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/ CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 предназначены для использования в проточных цитометрах Cytomics FC 500, Navios и Navios EX. Реагенты также используются с системой tetraCXP для системы проточной цитометрии FC 500, программным обеспечением Navios tetra для системы Navios и программным обеспечением Navios EX tetra для системы Navios EX.

Эти реагенты, отдельно или в сочетании с автоматизированными системами, предназначены для диагностики in vitro и позволяют одновременно определить и подсчитать методом проточной цитометрии в цельной крови общее содержание CD3+, общее содержание CD4+, общее содержание CD8+, двойные CD3+CD4+, двойные CD3+CD8+ и/или общее содержание CD3+, CD19+ и CD3–CD56+, процентное содержание лимфоцитов и абсолютные значения.[1,2,3] Эти системы также вычисляют отношение CD4/CD8 при использовании CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/ CD3-PC5. Эти реактивы предназначены для использования в иммунологическом обследовании пациентов, у которых присутствует иммунодефицит или подозрение на иммунодефицит.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов периферической крови человека состоит из клеток трех типов: Т-клеток (происходят из тимуса), В-клеток (происходят из костного мозга) и NK-клеток (натуральные киллеры).[4] Эти типы клеток нельзя разделить морфологически при помощи микроскопии, но можно различить по характерным антигенным детерминантам на поверхности их клеточных мембран.

Т-, В- и NK-лимфоциты играют центральную роль в функционировании иммунной системы. Различные подтипы Т-лимфоцитов способны распознавать конкретные антигены, выполнять функции эффекторных клеток, управлять типом и интенсивностью клеточного и/или гуморального иммунного ответов. После активации антигенами или макрофагами посредством Т-лимфоцитов особые В-лимфоциты начинают дифференцироваться в плазматические клетки, производящие и выделяющие специфические иммуноглобулины (Ig). NK-лимфоциты были идентифицированы как отдельная популяция цитолитических эффекторных клеток, которые, по-видимому, играют ключевую роль в регуляции гематопоэза, в защите от инфекций и в разрушении клеток злокачественных опухолей. Цитолитическая активность NK-лимфоцитов не контролируется антигенами классов I и II главного комплекса гистосовместимости (MHC).[4]

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Лимфоциты CD3+, CD4+, CD8+ и (или) CD19+

Процентную долю и абсолютные количества лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+ можно использовать для оценки состояния иммунной системы и его значения для известных или неизвестных заболеваний, а также для мониторинга уровней этих клеток при трансплантации органов.[17,25,26,27,28,29,30,31,32,33]

Например, идентификация аномального уровня лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+ может помочь при диагностике и/или определении прогноза неидентифицированных болезненных состояний с низким числом лейкоцитов. Изменение процентной доли лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+ после трансплантации органов (почки, сердца, печени, легкого) свидетельствует о том, что измерение числа Т-лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+) и/или В-лимфоцитов (CD19+) может быть полезно при мониторинге данных клеточных популяций.

Выявление аномально низкого уровня клеток CD4+ (иммунодефицита) и соответствующих соотношений CD4+/CD8+ также может помочь в постановке диагноза и/или определении прогноза заболеваний, связанных с иммунной недостаточностью. Например, инфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который является этиологическим агентом синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), приводит к выраженной иммунноdепрессии, в первую очередь, из-за селективного падения уровня CD4+ лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к этому вирусу.[17,34]Прогрессирующее клиническое и иммунологическое истощение, как правило, коррелирует с уменьшением числа лимфоцитов CD4+.[17]

Лимфоциты CD3–CD56+

Популяции NK-лимфоцитов функционально определяются как популяции лимфоцитов, способные проявлять против мишеней, таких как опухолевые и инфицированные вирусами клетки, цитотоксичность, не связанную с MHC.[35]

Соотношение CD4/CD8

Связанные с заболеваниями изменения в уровнях лимфоцитов CD4+ и CD8+ могут повлиять на соотношение CD4/CD8 (клетки-индукторы: клетки-супрессоры/цитотоксические). В связи с этим, соотношение CD4/CD8 может быть полезным индикатором состояния иммунной системы при диагностике и определении прогноза заболеваний.

Соотношение CD4/CD8 в сочетании с количеством лимфоцитов CD4+ широко используется для лабораторной оценки СПИД-ассоциированного комплекса и СПИДа.[17,36] Соотношение CD4/CD8 у пациентов с прогрессирующим СПИДом приближается к нулю, а лимфоциты CD4+ не определяются.[17] В таких случаях уровень лимфоцитов CD8+ может быть нормальным, повышенным или пониженным. Пониженная процентная доля лимфоцитов CD4+ и CD8+ без существенных изменений соотношения CD4/CD8 наблюдалась у пациентов со стабильным функционированием почечного аллотрансплантата.[5] Кроме того, пониженное соотношение CD4/CD8 и низкая процентная доля лимфоцитов CD4+ зафиксирована у пациентов в ходе фенотипической перестройки после трансплантации очищенного аутологичного костного мозга.[31,32]

Панель Lymphocyte Immunophenotyping (иммунофенотипирование лимфоцитов)

Реагент CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/ CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 позволяет выполнить подсчет основных популяций лимфоцитов пациента: клеток Т, В и NK. Данный реагент может служить средством контроля качества (LymphoSum) для оценки выхода лимфоцитов по селектору CD45/SS

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(соответствует всем субпопуляциям лимфоцитов). Общий процент лимфоцитов может быть определен по следующей формуле:

Суммарный процент лимфоцитов (%) = %CD3+(T) + %CD19+(B) + %CD3–CD56+(NK).[47,48]

При использовании в качестве панели, реагенты CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 также функционируют как средство контроля качества образца по общему проценту лимфоцитов и измерения количества CD3+ лимфоцитов в панели (интрапанельная проверка CD3+).[48]

ПРИНЦИПЫ ТЕСТА

Этот тест основан на способности моноклональных антител связываться с поверхностью клеток, экспрессирующих отдельные антигенные детерминанты. Специфическое окрашивание клеток осуществляется путем инкубации цельной крови с реагентом, содержащим моноклональные антитела. Реагенты с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 являются комбинацией четырех типов мышиных моноклональных антител, каждое из которых конъюгировано с конкретным флуорохромом и специфично к определенным поверхностным клеточным антигенам.

Эритроциты лизируются с помощью системы реагентов COULTER IMMUNOPREP на рабочей станции TQ-Prep. Оставшиеся белые кровяные тельца анализируются путем проточной цитометрии с использованием селекторов лимфоцитов. На первой гистограмме для каждого из реактивов селектор лимфоцитов определяется как имеющий яркую флуоресценцию CD45+ FITC и низкое боковое рассеяние (SS).

Для CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/CD3–PC5 следующие гистограммы/графики используются для определения процента положительно окрашенных клеток: CD3+ (только положительная PC5 флуоресценция), CD3+CD4+ (положительная PC5/RD1 флуоресценция), CD3+CD8+ (положительная PC5/ECD флуоресценция).
Для CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/ CD19-ECD/CD3–PC5 следующие гистограммы/графики используются для определения процента положительно окрашенных клеток: CD3+ (только положительная PC5 флуоресценция), CD3–CD56+ (только положительная RD1 флуоресценция), CD3-CD19+ (только положительная ECD флуоресценция).

Программное обеспечение tetraCXP, Navios tetra или Navios EX tetra в сочетании с реагентами с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/ CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/ CD56RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 позволяет выполнять автоматизированный анализ субпопуляций лимфоцитов. (Использование этих реагентов с указанными системами и их соответствующие рабочие характеристики приведены в tetraCXP SYSTEM Guide (Руководство по эксплуатации системы tetraCXP), Navios tetra Software System Guide (Руководство по системе программного обеспечения Navios tetra) или Navios EX tetra Software System Guide (Руководство по системе программного обеспечения Navios EX tetra).)

РЕАГЕНТЫ

Смотрите таблицу на странице 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

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

Концентрация реагентов, не являющихся антителами, составляет: 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

1. Эти реагенты содержат 0,1% азида натрия. В кислой среде из азида натрия образуется азотистоводородная кислота, крайне токсичное соединение. При утилизации азидные соединения должны смываться проточной водой. Для избежания отложения материалов в металлических трубах, в результате чего может возникать угроза взрыва, рекомендуется соблюдать эту меру предосторожности. При попадании в глаза или на кожу тщательно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
3. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
4. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. При хранении или инкубации сводите к минимуму воздействие света на реагенты.
6. Избегайте микробного загрязнения реагента, в противном случае возможно получение ошибочных результатов.
7. При работе с реагентом следуйте принципам надлежащей лабораторной практики (GLP).
8. Проверьте все графики данных и гистограммы до составления отчета о результатах. Обратитесь к разделу «Сбор данных методом проточной цитометрии / Процедура анализа».
9. При получении данных без применения автоматического анализа и с использованием системы проточной цитометрии FC 500 с программным обеспечением CXP убедитесь, что для всех отображаемых точечных диаграмм параметр «Events» (События) установлен на 100%.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент стабилен до истечения срока годности при хранении при температуре 2–8°C. Открытые флаконы стабильны 90 дней при хранении при температуре 2–8°C. Доведите реагент до температуры 2-8°C сразу после использования. Не замораживать. Минимизируйте воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств данного реагента (обычно это прозрачная розовая жидкость) или любые серьезные отклонения в показаниях, полученных для контрольных проб, могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагент использовать нельзя.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Эти реагенты с моноклональными антителами CYTO-STAT используются прямо из флакона. Доведите реагент до температуры 20–25°C перед использованием.

СБОР ОБРАЗЦОВ

- Для каждого анализа проточной цитометрии требуется 100 µL цельной крови.
- Оптимальное окрашивание достигается при количестве лейкоцитов в пределах 3-10 x 10^3 клеток/µL.
- При количестве лейкоцитов более 10 x 10^3 клеток/µL может потребоваться разбавление.
- При количестве лейкоцитов ниже 3 x 10^3 клеток/µL может потребоваться провести центрифугирование и повторное получение суспензии с аутологической плазмой.
- Для получения подробной информации о сборе цельной крови путем венепункции и условиях, мешающих процедуре, см. раздел «Процедура сбора диагностических образцов крови путем венепункции».[38]

1. Возьмите образец венозной крови путем венепункции в пробирку для сбора крови в стерильных условиях с использованием рекомендованного антикоагулянта (ЭДТА).
2. Подсчитайте общее количество белых кровяных телец, используя установленную процедуру.
3. Образцы с количеством лейкоцитов вне пределов нормального диапазона 3–10 x 10^3 клеток/µL могут потребовать разведения или концентрации.

ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ РЕАГЕНТА CYTO-STAT С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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

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

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Система реагентов COULTER IMMUNOPREP для рабочей станции COULTER TQ-Prep, номер по каталогу 7546999 — 300 тестов

Разбавитель (если требуется) аутологическая плазма

Набор реагентов CYTO-COMP, номер по каталогу 6607021 (4 x 0,5 mL)

ИЛИ

Набор QuickCOMP 4, номер по каталогу 177017

Набор клеток CYTO-COMP, номер по каталогу 6607023 (5 x 1 mL)

ИЛИ

IMMUNO-TROL Control Cells, номер по каталогу 6607077

ИЛИ

IMMUNO-TROL Low Cells, номер по каталогу 6607098

Калибровочные частицы Flow-Count, номер по каталогу 7547053 (20 mL)
(дополнительно поставляемый реагент для технологии единой платформы (SPT) или для абсолютных подсчетов SPT)

Пробирки 12 x 75 мм

Пробирки для сбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Переносящие пипетки

Пипетка Пастера

Микропипетки

Вращательная мешалка

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проточный цитометр

Счетчик клеток или гемацитометр

Комплект фильтров для одномодового лазера, только для проточного цитометра Cytomics FC 500, номер по каталогу 179044

ИЛИ

Узел модуля фильтров для одномодового лазера, только для проточного цитометра Cytomics FC 500, номер по каталогу 179045

Аппликаторы с ватными наконечниками

ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦА

ПРИМЕЧАНИЕ. При использовании автоматического пипетирующего устройства убедитесь, что в следующей процедуре используются объемы образца и реагента.

1. Для каждой пробы необходимо пометить две пробирки 12 x 75 мм, по одной для каждого реагента с моноклональными антителами из панели на две пробирки.
2. Добавьте 10 µL CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 или CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56-RD1/ CD19–ECD/CD3–PC5 в соответствующую помеченную тестовую пробирку.
3. Добавьте 100 µL образца венозной крови в каждую тестовую пробирку. Соблюдайте осторожность, чтобы избежать попадания крови на верхнюю и боковые части пробирок; в противном случае лизис может быть неполным.
4. Осторожно перемешайте на вортексе. Инкубируйте реактивные смеси при 20-25°C в течение 10-12 минут.

ВАЖНО! Если капли крови остаются вокруг верхней части или на стенках тестовой пробирки, их необходимо удалить, так как в противном случае нелизированные эритроциты могут контаминировать конечную пробу и исказить результаты. Для удаления капель можно использовать ватную палочку.

5. Выполните лизирование эритроцитов в каждой тестовой пробирке, используя систему реагентов COULTER IMMUNOPREP.

ПРИМЕЧАНИЕ. В случае использования флуоросфер Flow-Count перемешайте на вортексе флакон флуоросфер Flow-Count и добавьте по 100 µL в каждую тестовую пробирку.

6. Проанализируйте клетки на или проточных цитометрах Cytomics FC 500, Navios или Navios EX. Следуйте процедуре «Сбор данных методом проточной цитометрии / процедуре анализа» приведенной ниже.

ПРИМЕЧАНИЕ. В случае использования флуоросфер Flow-Count, приготовленные пробы необходимо проанализировать в течение 2 часов после добавления флуоросфер Flow-Count в каждую пробирку.

a. Значения флуоресценции проточной цитометрии необходимо регистрировать на логарифмической шкале.
b. Прямое рассеяние (FS) и боковое рассеяние (SS) необходимо регистрировать на линейной шкале.

АБСОЛЮТНЫЙ ПОДСЧЕТ

Абсолютный подсчет можно проводить двумя методами. Метод двойной платформы (также известный как стандартный (непрямой) метод) вычисляет абсолютные значения, комбинируя результаты гематологического исследования и проточной цитометрии, и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/µL) =
Общее количество лейкоцитов (клеток/µL) x
% лимфоцитов x % положительно-окрашенных клеток ÷ 10^4

Метод единой платформы Flow-Count (также известный как прямой метод, или SPT) использует флуоросферы Flow-Count для непосредственного определения абсолютных значений и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/µL) =
(Общее количество подсчитанных интересуемых к леток ÷
Общее количество подсчитанных флуоросфер Flow-Count) x Измеренная концентрация флуоросфер Flow-Count

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для значения рассеяния света и интенсивности флуоресценции в соответствии с рекомендациями изготовителя (см. Instrument Manuals (Руководства по эксплуатации приборов)).
2. Флуорохромы флуоресцеин изотиацианат (FITC), фикоэритрин (RD1), фикоэритрин-Texas Red-X (ECD) и фикоэритрин-Cy5 (PC5) излучают свет на разных длинах волн, но при этом возникает наложение спектров, которое нужно корректировать методом электронной компенсации.
   a. Оптимальные уровни полной матричной компенсации на проточных цитометрах FC 500, Navios и Navios EX могут быть установлены с помощью отдельного анализа клеток CYTO-COMP, окрашенных с набором QuickCOMP 4 при использовании применимой программы AutoSetup.
3. Перед началом анализа проб измеряемый контроль (например, клетки IMMUNO-TROL Cells или низкочисленные клетки IMMUNO-TROL Low Cells) следует окрасить для проверки компенсации и реакционной способности антител.
4. Специфическое и/или неспецифическое Fc связывание антител с моноцитами и гранулоцитами, имеющимися в пробе, можно исключить путем надлежащей селекции лимфоцитов в проточном цитометре.[39] Лимфоциты идентифицируются на основе яркой флуоресценции CD45+ и низкого бокового рассеяния.[40]
5. Отрицательно окрашенные популяции можно использовать для установки курсора.[37]

СБОР ДАННЫХ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ / ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

ОСТОРОЖНО! Если лазер проточного цитометра смещен, установлены неправильные фильтры или если селекторы были установлены неправильно, результаты могут оказаться ошибочными.

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

Протокол селекции вручную:

1. Выберите параметры: FS Lin, SS Lin, FL1 Log, FL2 Log, FL3 Log и FL4 Log.
2. Создайте следующие графики:
   - Зависимость FL1 Log (CD45) от SS Lin
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FL2 Log (CD4)
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FL3 Log (CD8)
   - Гистограмма FL4 Log (CD3)
   - Зависимость FL3 Log (CD8) от FL2 Log (CD4)
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FS (дополнительно для абсолютных значений технологии единой платформы (SPT))
3. Создайте области и селекторы:
   a. Создайте область A в скоплении лимфоцитов, которое появится на графике FL1/SS (см. Рисунок 1a).
   b. Определите селектор A на графиках зависимости FL4 от FL2, FL4 от FL3 и гистограмме FL4 (см. Рисунок 1b-1d).
   c. Создайте квадрантные области на графиках зависимости FL4 от FL2 и FL4 от FL3 (см. Рисунок 1b и 1c).
   d. Создайте линейную область D на гистограмме FL4 (см. Рисунок 1d).
   e. Определите селектор D на графике зависимости FL3 от FL2 (см. Рисунок 1e).
   f. Создайте квадрантную область на графике зависимости FL2 от FL3 (см. Рисунок 1e).
4. Дополнительно для абсолютных значений технологии единой платформы (SPT):
   a. Создайте прямоугольную область под названием «CAL» на графике зависимости FL4 от FS (см. Рисунок 1f).
5. Проверьте следующие настройки:
   - Гистограмма остановки подсчета = 6 000 событий лимфоцитов, прошедших селекцию (гистограмма FL4)
   - Скорость потока = высокая
   - Максимальное количество событий = 100 000
   - Время остановки = 300 секунд
   - Дискриминатор = FS линейный = 100
   - Требуемая статистика выбрана (клеток/µL, количество, % прошедших селекцию)
6. Сохранить протокол (например, tetraCHROME 45-4-8-3.pro).

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

Протокол селекции вручную:

1. Выберите параметры: FS Lin, SS Lin, FL1 Log, FL2 Log, FL3 Log и FL4 Log.
2. Создайте следующие графики:
   - Зависимость FL1 Log (CD45) от SS Lin
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FL2 Log (CD56)
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FL3 Log (CD19)
   - Гистограмма FL4 Log (CD3)
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FS (дополнительно для абсолютных значений технологии единой платформы (SPT))
3. Создайте области и селекторы:
   a. Создайте область A в скоплении лимфоцитов, которое появится на графике FL1/SS (см. Рисунок 2a).
   b. Определите селектор A на графиках зависимости FL4 от FL2, FL4 от FL3 и гистограмме FL4 (см. Рисунок 2b-2d).
   c. Создайте квадрантные области на графиках зависимости FL4 от FL2 и FL4 от FL3 (см. Рисунок 2b и 2c).
   d. Создайте линейную область D на гистограмме FL4 (см. Рисунок 2d).
4. Дополнительно для абсолютных значений технологии единой платформы (SPT):
   a. Создайте прямоугольную область под названием «CAL» на графике зависимости FL4 от FS (см. Рисунок 2e).
5. Проверьте следующие настройки:
   - Гистограмма остановки подсчета = 10 000 событий лимфоцитов, прошедших селекцию (гистограмма FL4)
   - Скорость потока = высокая
   - Максимальное количество событий = 100 000
   - Время остановки = 300 секунд
   - Дискриминатор = FS линейный = 100

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Требуемая статистика выбрана (клеток/µL, количество, % прошедших селекцию)

6. Сохранить протокол (например, tetraCHROME 45-56-19-3.pro).

ПРИМЕЧАНИЕ. Обратитесь к соответствующим Инструкциям по использованию прибора для получения дополнительных инструкций по созданию протоколов. Например, для добавления статистики, FlowPAGES, отметки дополнительного параметра и настройки, показывающие % в области.

Процедура анализа:

1. Прогон подготовленной пробы CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/ CD3-PC5.
   a. Постройте двухпараметрическую гистограмму зависимости CD45-FITC (FL1 Log) от SS Lin (графики). Может быть заметен трехчастный дифференциал. Измените селектор (**A**), чтобы в него входили лимфоциты с яркой флуоресценцией CD45+ FITC и низким SS (см. Рисунок 1a). В данном анализе приоритет отдается включению всех лимфоцитов, в то время как моноциты (с экспрессией меньше CD45 и промежуточным SS) и базофилы (с экспрессией меньше CD45 и низким SS) должны быть максимально исключены.
   b. Установите границы области на двухпараметрических гистограммах (графиках), чтобы сгруппировать двойные негативные популяции (CD3–CD4– и CD3–CD8–) и вплотную обвести популяции CD3+CD4– и CD3+CD8–, как показано на Рисунках 1b и 1c. Установите границу области на гистограмме общего количества CD3+, чтобы произвольно обвести популяцию CD3+, как показано на Рисунке 1d.

ПРИМЕЧАНИЕ. Гранулоциты (GR), базофилы (BA), моноциты (MO) и области органических остатков, как показано на Рисунке 1a.

2. Выполните прогон подготовленной пробы CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/ CD19-ECD/CD3-PC5.
   a. Постройте двухпараметрическую гистограмму зависимости CD45-FITC (FL1 LOG) от SS Lin (графики). Может быть заметен трехчастный дифференциал. Измените селектор (**A**), чтобы в него входили лимфоциты с яркой флуоресценцией CD45+ FITC и низким SS (см. Рисунок 2a). В данном анализе приоритет отдается включению всех лимфоцитов, в то время как моноциты (с экспрессией меньше CD45 и промежуточным SS) и базофилы (с экспрессией меньше CD45 и низким SS) должны быть максимально исключены.

ПРИМЕЧАНИЕ. Гранулоциты (GR), базофилы (BA), моноциты (MO) и области органических остатков, как показано на Рисунке 2a.

   b. Установите границы области на двухпараметрических гистограммах (графиках), чтобы сгруппировать двойные негативные популяции (CD3–CD19– и CD3–CD56–) и вплотную обвести популяции CD3+CD19– и CD3+CD56, как показано на Рисунках 2b и 2c. Установите границу области на гистограмме общего количества CD3+, чтобы произвольно обвести популяцию CD3+, как показано на Рисунке 2d.

3. В таблице ниже указаны квадранты / области и гистограммы, используемые для подсчета каждой популяции:

Популяция	**Квадрант / Область**	**Рисунок гистограммы №**
Общее количество CD3+	CD3+	Маски 1d и 2d
CD3+CD4+	2	1b
CD3+CD8+	2	1c
CD19+	1	2c
CD3–CD56+	1	2b

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

На рисунках с 1a по 1f представлены данные, полученные после анализа нормальной цельной крови, обработанной реагентами tetraCHROME CD45/CD4/CD8/CD3.

Рисунок 1a. Точечная диаграмма зависимости CD45-FITC (FL1 Log) от бокового рассеяния для определения лимфоцитов (селектор A), гранулоцитов (GR), базофилов (BA), моноцитов (MO) и органических остатков.

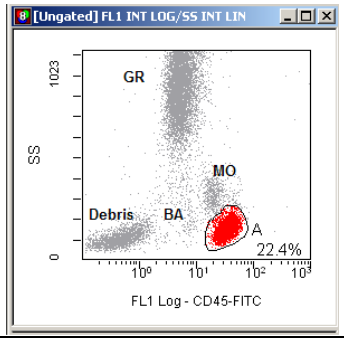


Рисунок 1b. Точечная диаграмма зависимости CD3-PC5 (FL4 Log) от CD4-RD1 (FL2 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

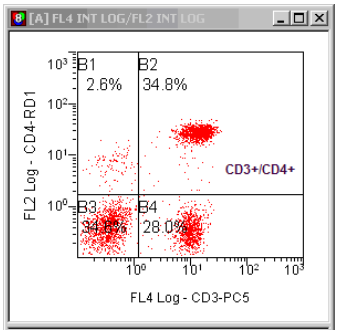


Рисунок 1c. Точечная диаграмма зависимости CD3-PC5 (FL4 Log) от CD8-ECD (FL3 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

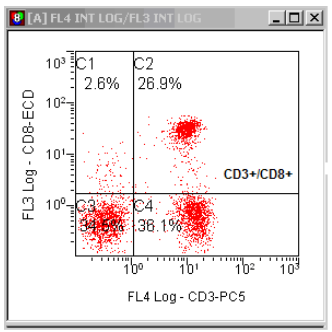


Рисунок 1d. Гистограмма CD3-PC5 (FL4 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

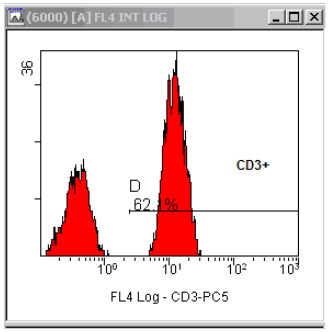


Рисунок 1e. Точечная диаграмма зависимости CD8-ECD (FL3 Log) от CD4-RD1 (FL2 Log) с селектором CD3+ лимфоцитов (селектор A+D).

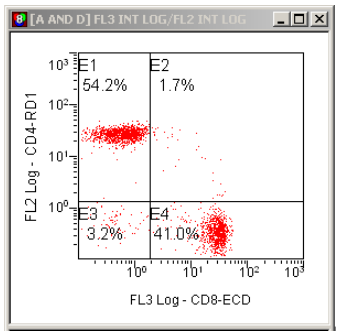
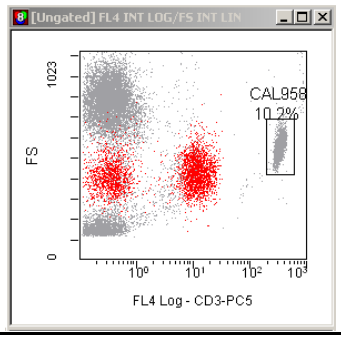


Рисунок 1f. Дополнительный график для абсолютных значений технологии единой платформы: Точечная диаграмма зависимости негейтированного FL4 Log от FS с областью «CAL».



На рисунках с 2a по 2e представлены данные, полученные после анализа нормальной цельной крови, обработанной реагентами tetraCHROME CD45/CD56/CD19/CD3.

Рисунок 2a. Точечная диаграмма зависимости CD45-FITC (FL1 Log) от бокового рассеяния для определения лимфоцитов (селектор A), гранулоцитов (GR), базофилов (BA), моноцитов (MO) и органических остатков.

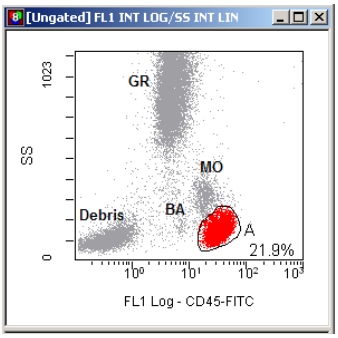


Рисунок 2b. Точечная диаграмма зависимости CD3-PC5 (FL4 Log) от CD56-RD1 (FL2 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

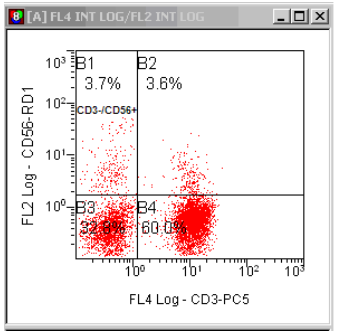


Рисунок 2c. Точечная диаграмма зависимости CD3-PC5 (FL4 Log) от CD19-ECD (FL3 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

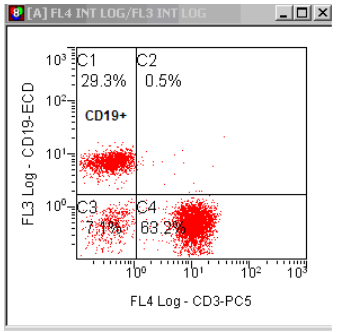


Рисунок 2d. Гистограмма CD3-PC5 (FL4 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

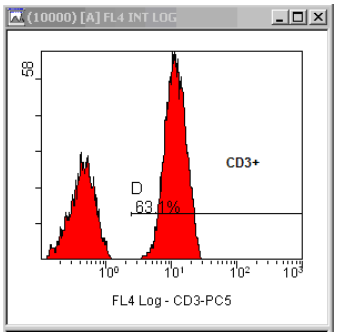
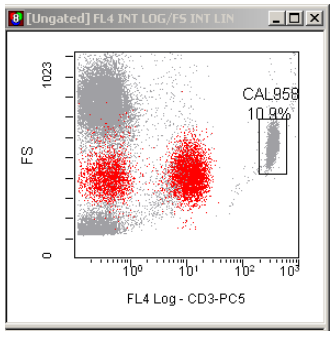


Рисунок 2e. Дополнительный график для абсолютных значений технологии единой платформы: Точечная диаграмма зависимости FL4 Log без селектора от FS с областью «CAL».



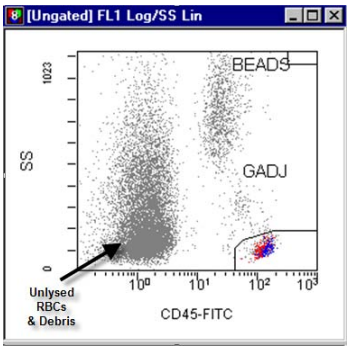
АНАЛИТИЧЕСКАЯ ПРОВЕРКА НАДЕЖНОСТИ СЕЛЕКЦИИ ВРУЧНУЮ

ВАЖНО! Существует риск сообщения ошибочных результатов. Для правильной интерпретации данных по рассеянию света, окрашиванию антителами с учетом всех селекторов и ограничений, используемых для тестирования, их должен просматривать специалист по лабораторной диагностике. Если результаты кажутся подозрительными, следуйте лабораторным процедурам.

Просмотр данных должен включать следующие этапы:

1. Просмотрите данные по рассеянию света.
   a. Убедиться в том, что интересуемая популяция(-и) находится выше дискриминатора и не произошла потеря клеток.
   b. Убедиться в том, что интересуемая популяция(-и) максимально разделена от других присутствующих популяций (в пределах биологических ограничений).
2. Просмотрите структуры окрашивания антителами.
   a. Убедиться в том, что в целом наблюдаются ожидаемые шаблоны окраски (флуоресцентное окрашивание коррелирует с антителом, используемым в образце препарата).
   b. Чрезмерно тусклое или отрицательное окрашивание пробы должно быть проверено на соответствие с клинической картиной и другими данными.
3. Просмотрите границы селектора и области.
   a. Селекторы и области должны обводить интересующие популяции и исключать нежелательные события.
   b. Не все эритроциты могут лизироваться в следующих условиях: ядросодержащие эритроциты, патологическая концентрация белка, гемоглобинопатия. Следует использовать CD45 в качестве условия селекции лимфоцитов, поскольку эритроциты, будучи CD45-негативными, не будут включены в лимфоцитарный селектор (см. Рисунок 3).[40]

Рисунок 3. Образец неполного лизирования эритроцитов



Для подтверждения точности селекции вручную необходимо проверить результаты селекции вручную на соответствие следующим критериям.

1. Для результатов окрашивания tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5:
   T-Sum:
   a. Данная проверка надежности известна, как проверка надежности по CD3+.
   b. В идеале сумма процентов CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток должна равняться общему проценту CD3+ клеток ±5%.
   c. В образцах, содержащих значительное количество гамма/дельта Т-лимфоцитов и (или) CD4/CD8 позитивных Т-лимфоцитов, результат данной проверки достоверности может превысить максимальное значение вариабельности.[37,47,48,49] В подобных случаях ошибки T-Sum вызываются биологическими свойствами образца, а не вариабельностью метода селекции вручную, и такие результаты могут быть приемлемыми.
   d. Для получения информации о действиях, которые необходимо предпринять, если критерий приемлемости для анализов превысил ± 5% и если образцы не содержат значительное число дважды отрицательных клеток и (или) дважды положительных CD4+CD8+ Т-клеток, см. этап 4.
   e. См. раздел ОГРАНИЧЕНИЯ 19 для получения дополнительной информации по критериям приемлемости T-Sum.
2. Для результатов окрашивания tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5:
   LymphoSum:
   a. Общий процент лимфоцитов может быть определен по следующей формуле: Суммарный процент лимфоцитов (%) = %CD3+(T) + %CD19+(B) + %CD3–CD56+(NK).[47,48]
   b. В идеале LymphoSum должен быть >95%. Для получения информации о действиях, которые необходимо предпринять, если LymphoSum <90%, см. этап 4.
3. Для результатов окрашивания tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CD45–FITC/CD56–RD1/ CD19–ECD/CD3–PC5:
   Интрапанельная проверка CD3+:
   a. При интрапанельной проверке CD3+ внутренним контролем служит вариабельность CD3 между пробирками.[48]
   b. Различия при воспроизведении результатов анализа CD3 между пробирками должны быть ±3,5%.
   c. Для получения информации о действиях, которые необходимо предпринять в отношении анализа при превышении критериев приемлемости ±3,5%, см. этап 4.
4. Результаты, превышающие критерии приемлемости, должны быть проверены на правильное расположение селектора и области. Если проблема не решается таким образом, необходимо провести повторный анализ проб и (или) приготовить и проанализировать новые пробы.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Образцы должны быть приготовлены с использованием реагентов CYTO-STAT tetraCHROME и системы реагентов IMMUNOPREP в течение 24 часов после сбора.
2. Если анализ методом проточной цитометрии будет выполнен в течение 2 часов, то подготовленные пробы можно хранить при комнатной температуре в защищенном от света месте. В противном случае закройте пробу и храните ее в темном месте при 2–8 . Пробу нужно проанализировать в течение 24 часов после приготовления.
3. Для подсчета абсолютного количества клеток методом Flow-Count [Технология единой платформы] пробы необходимо проанализировать в течение 2 часов после добавления флуоросфер Flow-Count.
4. Для подсчета абсолютного количества клеток методом двойной платформы гематологический анализ должен быть проведен согласно маркировке на соответствующем гематологическом анализаторе. Удостоверьтесь, что выполняются ограничения по возрасту и обработке указанных образцов.
5. Для анализа методом проточной цитометрии с помощью tetraCXP, Navios tetra или Navios EX tetra обратитесь к соответствующим System Guides (Руководствам по системам), чтобы узнать об ограничениях по стабильности образца и приготовленной пробы.
6. Для применения реагентов tetraCHROME на проточном цитометре серии FC 500 необходимо использовать комплект фильтров для одномодового лазера (номер по каталогу 179044) или узел модуля фильтров для одномодового лазера (номер по каталогу 179045).
7. До окрашивания и анализа образцы должны оставаться в пробирках, в которых собирали кровь, их следует хранить при комнатной температуре.
8. Не помещайте образцы в холодильник. Охлажденные образцы могут дать ошибочные результаты.
9. Рекомендуемая жизнеспособность клетки для венозного образца крови составляет >90%.
10. Реагенты с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME предназначены для использования с препаратами цельной крови. Также их можно применять с клетками IMMUNO-TROL Cells и (или) низкочисленными клетками IMMUNO-TROL Low Cells. Реагенты не рекомендуется использовать со свежими и замороженными препаратами мононуклеарных клеток.
11. Не допускайте разбавления, отбора аликвот или замораживания реагентов. Используйте реагенты только из исходной упаковки.
12. Эти реагенты предназначены исключительно для проточной цитометрии.
13. У пациентов, проходивших лечение антителами к человеческим моноклональным антителам, обнаружение специфических выявляемых антигенов может быть снижено или отсутствовать вследствие частичной или полной блокировки антителами, применявшимися для лечения.[41,42,43]
14. Патологические состояния не всегда сопровождаются патологическими изменениями процентного содержания популяций лейкоцитов. У больного человека процентное соотношение лейкоцитов может быть таким же, как и у здорового. Используйте результаты анализа с учетом клинических и других диагностических данных.
15. С некоторыми пациентами могут возникать особые проблемы ввиду измененного или очень низкого числа клеток некоторых клеточных популяций.
16. У пациентов с хронической ВИЧ-инфекцией или при нарастании виремии наблюдаемое количество NK-лимфоцитов может оказаться меньше ожидаемого из-за фенотипического сдвига подгруппы NK-клеток. В таких клинических условиях происходит селективная потеря $CD56^{dim}$/CD16+ субпопуляции NK-клеток и увеличение других патологических популяций NK-клеток. Используйте результаты тестирования в сочетании с клиническими и другими диагностическими данными.[45,46]
17. Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, могут быть ошибочными, если лазер неверно отъюстирован или неправильно установлены селекторы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

18. Из-за неприемлемого разброса результатов применения разных лабораторных методов для подсчета абсолютного числа лимфоцитов необходимо проводить проверку точности используемого метода[44].
19. В некоторых образцах чистота региона лимфоцитов может быть снижена за счет загрязнения нелимфоидными элементами с низким SS и высокой флуоресценцией CD45, аналогичной таковой у популяций лимфоцитов. Данные образцы могут удовлетворять критерию приемлемости T-sum, поскольку доля CD3+CD4+ и CD3+CD8+ остается постоянной, однако результат может оказаться неверен. Рекомендуется просматривать диаграммы данных всех образцов на предмет присутствия ожидаемой структуры прокрашивания.
20. Рабочие характеристики для применения в педиатрической практике не установлены.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD45 экспрессируется на всех типах гематопоэтических клеток, за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников. Он не был выявлен в дифференцированной негематопоэтической ткани.[7,8,9,10]

Антиген CD3 обычно присутствует на клеточной поверхности зрелых тимоцитов, а также неактивированных и активированных зрелых Т-лимфоцитах периферической крови как индуцирующей, так и супрессорной/цитотоксической популяции.[12,13,14]

Антиген CD4 присутствует на тимоцитах и индуцирующей популяции Т-лимфоцитов в периферической крови.[13,14] В небольших количествах он также экспрессируется на моноцитах.[17]

Антиген CD8 обычно присутствует приблизительно на 80% тимоцитов и примерно на 30–35% Т-лимфоцитов периферической крови, а также на некоторых природных клетках-киллерах.[15,18]

Антиген CD19 экспрессируется на всех В-клетках, включая ранние клетки-предшественники В-клеток.[3] Его также можно обнаружить на фолликулярных дендритных клетках и клетках-предшественниках миеломоноцитарной линии, однако он не экспрессируется на Т-клетках, моноцитах и гранулоцитах.[1,19,20]

Антиген CD56 экспрессируется только на субпопуляции лимфоцитов, обладающих активностью натуральных киллеров (NK).[1,19,21] В результате экспрессии CD56 практически все эти клетки способны запускать в периферической крови цитотоксические реакции (не связанные с TCR).[21,22] Эта субпопуляция состоит из клеток-натуральных киллеров (CD3–CD56+) и небольшой подгруппы Т-клеток (CD3+CD56+).[1,19,23] CD56 не экспрессируется на других популяциях Т- или В-лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и эритроцитов.[23,24,25]

Об антигенной специфичности моноклональных антител CD45, CD3, CD4 и CD8, входящих в состав реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4-RD1/ CD8–ECD/CD3-PC5, уже сообщалось в материалах First International Workshop for Leukocyte Typing (Первого Международного семинара по типизации лейкоцитов) и Fifth International Workshop for Leukocyte Typing (Пятого Международного семинара по типизации лейкоцитов).[1,2]

Об антигенной специфичности моноклональных антител CD45, CD3, CD19 и CD56, входящих в состав реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/ CD19–ECD/CD3-PC5, уже сообщалось в материалах First International Workshop for Leukocyte Typing (Первого Международного семинара по типизации лейкоцитов), Fourth International Workshops for Leukocyte Typing (Четвертого Международного семинара по типизации лейкоцитов) и Fifth International Workshop for Leukocyte Typing (Пятого Международного семинара по типизации лейкоцитов).[6,11]

Для оценки клеточной перекрестной реактивности был выполнен скрининг моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD19 и CD56, входящих в состав реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/ CD8-ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/ CD19–ECD/CD3-PC5, на пробах крови здоровых взрослых людей-доноров. Результаты последовательно демонстрировали, что моноклональные антитела к CD3, CD4, CD8, CD19 и CD56 специфично реагировали с соответствующими популяциями лимфоцитов. Моноциты слабо окрашивались моноклональными антителами к CD4.

Проточные цитометры Cytomics FC 500 и EPICS XL/XL-MCL

ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

Оценка степени согласованности значений между реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/ CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56-RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 и прибором сравнения tetraONE изучалась на нормальных и патологических пробах лизированной цельной крови с помощью проточной цитометрии (проточные цитометры COULTER EPICS XL-MCL и Cytomics FC 500 с селекцией лимфоцитов). Эти данные представлены в следующей таблице и на Рисунке 4 ниже. Они подтверждают предпосылку того, что реагенты эквивалентны по своей реактивности взрослым Т- и В-лимфоцитам и NK-лимфоцитам в периферической крови. Значения выражены в процентах (%) от общего количества лимфоцитов.

% лимфоцитов CD3+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
Комбинированный tetraONE	123	47,2	92,7	76,4 ±9,5
Селекция вручную	246	47,4	92,3	76,7 ±9,2

% лимфоцитов CD3+CD4+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
tetraONE 45/4/8/3	123	1,3	72,9	30,2 ±14,8
Селекция вручную	246	1,2	74,3	30,4 ±15,0

% лимфоцитов CD3+CD8+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
tetraONE 45/4/8/3	123	12,5	80,2	43,1 ±17,1
Селекция вручную	246	12,1	80,2	43,1 ±17,2

% лимфоцитов CD19+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
tetraONE 45/56/19/3	123	1,3	33,0	12,5 ±6,5
Селекция вручную	246	0,8	32,9	12,1 ±6,5

% лимфоцитов CD3–CD56+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
tetraONE 45/56/19/3	123	0,7	28,7	7,5 ±5,4
Селекция вручную	246	0,7	29,8	7,4 ±5,5

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

У практически здоровых мужчин и женщин были получены образцы цельной крови. Группа обследуемых включала жителей восточной части США и жителей восточной Канады различной расовой принадлежности и разного возраста (n = 24). Полученные значения не выходили за пределы ожидаемых диапазонов, ранее приведенного в tetraONE SYSTEM Guide (Руководство пользователя системы tetraONE) (n = 171).

Пробы окрашивались с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/ CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3-PC5. Значения, определенные методом проточной цитометрии (при помощи проточного цитометра COULTER EPICS XL-MCL или Cytomics FC 500 с селекцией лимфоцитов), отражают общее число клеток CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD19+ и CD3–CD56+ и приводятся в следующей таблице. Для каждой пробы было измерено количество лейкоцитов и пятичастная лейкоцитарная формула. Абсолютные значения определялись методом единой платформы Flow-Count. Полученные значения выражали в процентах (%) от общего числа лимфоцитов, а также как абсолютные значения (клеток/µL).

Эти значения приводятся исключительно как репрезентативные величины. Каждая лаборатория должна установить свой уровень ожидаемых значений, используя местную популяцию здоровых доноров.

НОРМАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЛЯ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ: CD45/CD4/CD8/CD3

% + лимфоциты	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
Общее количество CD3+	171	56	93	74,1 ±7,6
CD3+CD4+	171	29	76	48,9 ±8,5
CD3+CD8+	171	5	49	22,5 ±7,5
Абсолютное количество				
Общее количество CD3+	171	537	2 939	1 333 ±477
CD3+CD4+	171	321	2 124	878 ±334
CD3+CD8+	171	46	1 346	408 ±208

НОРМАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЛЯ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ: CD45/CD56/CD19/CD3

% + лимфоциты	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
Общее количество CD3+	171	55	94	74,0 ±7,5
CD3–CD56+	171	2	26	9,3 ±4,7
CD19+	171	1	37	13,6 ±5,3
Абсолютное количество				
Общее количество CD3+	171	572	3 008	1 365 ±484
CD3–CD56+	171	13	441	164 ±90
CD19+	171	14	816	253 ±143

ЛИНЕЙНОСТЬ

Три повторных измерения производили для каждого из восьми последовательных разбавлений концентрированной пробы контрольных клеток COULTER CYTO-TROL с целью получения диапазона концентраций лимфоцитов CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3–CD56+. Клетки окрашивали с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8-ECD/ CD3–PC5 или CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/ CD3–PC5 и анализировали методом проточной цитометрии (при помощи проточных цитометров COULTER EPICS XL-MCL and Cytomics FC 500 с селектором

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лимфоцитов). См. графики ниже на Рисунке 5. Полученные значения приведены в виде абсолютных величин (клетки/µL); они были определены с помощью метода сдвоенной платформы.

ТОЧНОСТЬ

Процентная доля и абсолютное количество положительно окрашенных клеток определялись при помощи клеток IMMUNO-TROL и низкочисленных клеток IMMUNO-TROL Low Cells в два прохода дважды в день до 20 дней в трех географически удаленных центрах с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/ CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56–RD1/ CD19–ECD/ CD3–PC5. Измерения были проведены на проточном цитометре Cytomics FC 500 (% положительных и абсолютных подсчетов) для популяций CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD19+ и CD3–CD56+, и они находились в рамках результатов анализа в соответствии с листками-вкладышами в упаковке контрольного продукта.

Общее число лимфоцитов CD3+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	348	72,5 ±1,5	56,7 ±1,1
Абсолютное количество	348	948 ±61	506 ±21
Лимфоциты CD3+CD4+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	174	46,6 ±1,0	15,9 ±0,7
Абсолютное количество	174	612 ±38	143 ±8
Лимфоциты CD3+CD8+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	174	23,1 ±0,8	35,4 ±1,1
Абсолютное количество	174	305 ±21	316 ±13
Лимфоциты CD19+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	174	15,8 ±0,6	23,0 ±1,0
Абсолютное количество	174	205 ±9	204 ±12
Лимфоциты CD3–CD56+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	174	8,2 ±0,4	13,2 ±0,6
Абсолютное количество	174	105 ±6	116 ±8

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 4. Точность метода для проточных цитометров Cytomics FC 500 и XL/XL-MCL

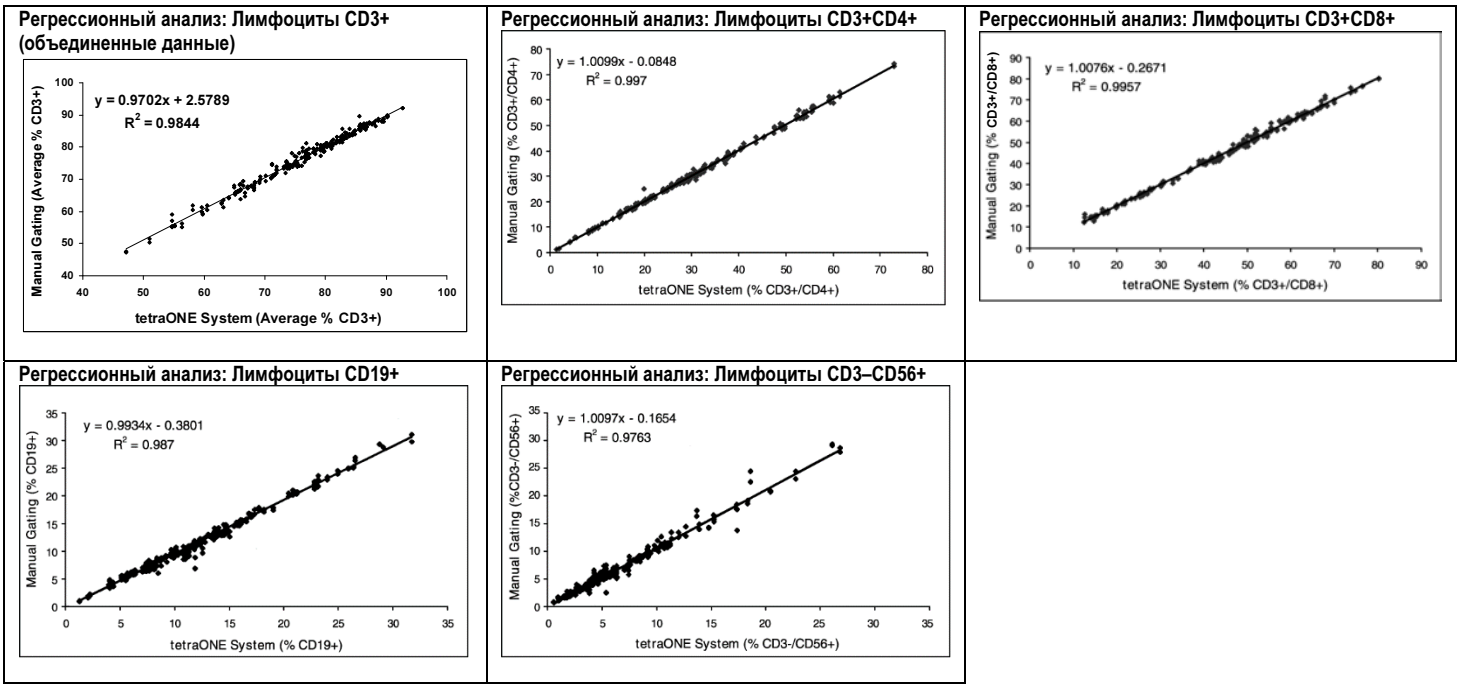
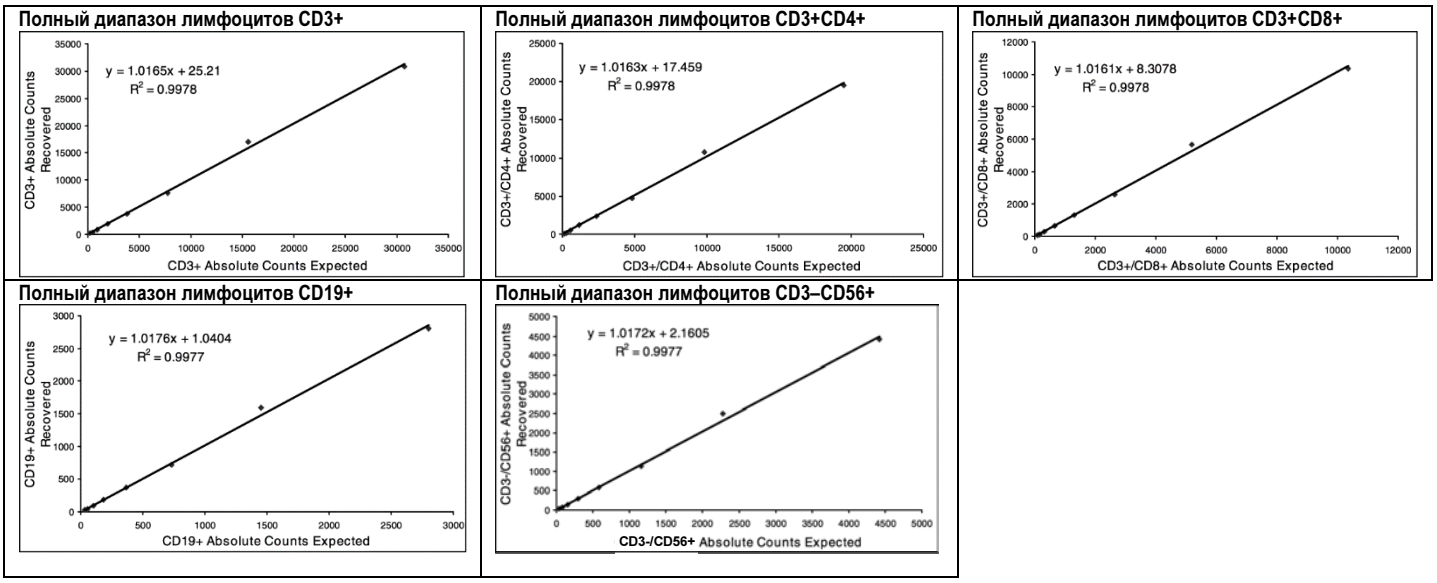


Рисунок 5. Линейность для проточных цитометров Cytomics FC 500 и XL/XL-MCL
ПРИМЕЧАНИЕ. Полученные значения приведены в виде абсолютных значений (клеток/µL).



Проточные цитометры Navios и Navios EX
ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

Проточный цитометр Navios
Оценка степени согласованности значений между реагентами с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 на Navios и приборе сравнения FC 500 с программным обеспечением CXP изучалась на нормальных и патологических пробах лизированной цельной крови с помощью проточной цитометрии. Точность оценивалась сравнением с результатами метода сравнения при использовании оценки разницы как описано в CLSI EP09-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples (Сравнение методов и оценочная погрешность при использовании проб пациента).[52] Эти данные, представленные в Таблицах 1a и 1b и на Рисунках 6 и 7 ниже, подтверждают предположение о том, что данные системы эквивалентны при подсчетах зрелых T, B и NK лимфоцитов в периферической крови. Значения указаны в процентных долях (%) от общего числа лимфоцитов и абсолютного количества (клеток/µL) для клеток CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3–CD56+.

Проточный цитометр Navios EX
Оценка степени согласованности значений между реагентами с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 на Navios EX и приборе сравнения Navios изучалась на нормальных и патологических пробах лизированной цельной крови с помощью проточной цитометрии. Точность оценивалась сравнением с результатами метода сравнения при использовании оценки разницы как описано в CLSI EP09-A3 Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples (Сравнение процедуры измерения и оценочная погрешность при использовании проб пациента).[54] Эти данные, представленные в Таблице 2 и на Рисунках 8a и 8b ниже, подтверждают предположение о том, что данные системы эквивалентны при подсчетах зрелых T, B и NK лимфоцитов в периферической крови. Значения указаны в процентных долях (%) от общего числа лимфоцитов и абсолютного количества (клеток/µL) для клеток CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3–CD56+.

Данные точности, представленные от Navios EX и прибора сравнения Navios, показывают, что результаты, полученные с использованием этих двух цитометров, являются сравнимыми. Следующие разделы (Ожидаемые значения, Линейность, Аналитические диапазоны измерения и Точность) представляют рабочие характеристики обоих проточных цитометров, Navios и Navios EX.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ
Для оценки границ нормальных значений для проточного цитометра Navios проведено исследование нормального диапазона. Пробы цельной крови были собраны у доноров (мужчин и женщин) из трех географически удаленных регионов. Выбор доноров соответствовал указаниям CLSI, EP28-A3, Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory (Определение, установление и проверка эталонных диапазонов в клинической лаборатории).[51]

Пробы окрашивались с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8-ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56-RD1/CD19–ECD/CD3–PC5. Значения, установленные на проточных цитометрах Navios, отображают общее количество CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3–CD56+ клеток и представлены в таблицах ниже (см. Таблицы 3a и 3b). Абсолютный подсчет был выполнен с использованием метода Flow-Count (SPT).

Полученные значения выражали в процентах (%) от общего числа лимфоцитов, а также как абсолютные значения (клеток/µL).

Для определения эталонного диапазона использовался доверительный интервал 95%.

Эти значения приводятся исключительно как репрезентативные величины. Каждая лаборатория должна установить свой уровень ожидаемых значений, используя местную популяцию здоровых доноров.

ЛИНЕЙНОСТЬ
Три повторных измерения производились для каждого из 19 независимых разбавлений (общее количество CD3+, CD3+CD4+ и CD3+CD8+) и 20 независимых разбавлений (общее количество CD3+, CD19+ и CD3–CD56+) концентрированной пробы контрольных клеток CYTO-TROL. Диапазоны концентраций общего количества лимфоцитов CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3-CD56+ были установлены посредством окрашивания с использованием реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 или CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 при добавлении флуоросфер Flow-Count и анализа методом проточной цитометрии (проточный цитометр Navios tetra с использованием селектора лимфоцитов). Статистическое определение линейности было выполнено согласно инструкции CLSI EP06-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline (Оценка линейности процедур количественного измерения: статистический подход; утвержденное руководство).[50] См. графики ниже на Рисунке 9. Полученные значения приведены в виде абсолютных значений (клеток/µL).

ДИАПАЗОНЫ АНАЛИТИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ
Предоставленные диапазоны аналитических измерений указывают на возможность анализа подсчета подгрупп лимфоцитов системой Navios. Диапазоны аналитических измерений системы Navios (см. Таблицу 4) получены на основе значений линейности и нижнего предела количественного определения:

- **Линейность:** Диапазоны, в пределах которых результаты прямо пропорциональны количеству аналита в образце согласно инструкции CLSI EP06-A.[50]
- **Нижний предел количественного определения:** Наименьшее количество аналита в образце, которое может быть определено количественным образом с указанным приемлемым уровнем точности и правильности при указанных лабораторных условиях согласно инструкции CLSI EP17-A.[53]

ТОЧНОСТЬ
Процентная доля и абсолютное количество положительно окрашенных клеток определялись при помощи IMMUNO-TROL и низкочисленных клеток IMMUNO-TROL Low Cells в два прохода дважды в день не менее 20 дней в одном центре с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CD45–FITC/CD56-RD1/CD19–ECD/CD3–PC5. Измерения были выполнены на проточном цитометре Navios. По полученным файлам была выполнена селекция вручную тремя независимыми операторами. Разброс значений от разных операторов рассчитывался в виде общих результатов.

CD45/CD4/CD8/CD3			
IMMUNO-TROL:			
Параметр	**Единицы измерения**	**Среднее значение**	**%CV (коэффициент вариации) (Оператор)**
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	70,95	1,6
	Абсолютное количество (клеток/µL)	754	0,4
CD3+CD4+	% + лимфоциты	45,49	1,3
	Абсолютное количество (клеток/µL)	484	0,9
CD3+CD8+	% + лимфоциты	22,69	0,0
	Абсолютное количество (клеток/µL)	241	2,5
CD45/CD56/CD19/CD3			
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	71,02	1,2
	Абсолютное количество (клеток/µL)	720	0,0
CD19+	% + лимфоциты	14,48	0,8
	Абсолютное количество (клеток/µL)	147	1,9
CD3–CD56+	% + лимфоциты	10,43	0,7
	Абсолютное количество (клеток/µL)	106	0,8

CD45/CD4/CD8/CD3			
IMMUNO-TROL LOW:			
Параметр	**Единицы измерения**	**Среднее значение**	**%CV (коэффициент вариации) (Оператор)**
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	55,77	2,9
	Абсолютное количество (клеток/µL)	336	0,5
CD3+CD4+	% + лимфоциты	21,07	2,2
	Абсолютное количество (клеток/µL)	127	1,4
CD3+CD8+	% + лимфоциты	30,54	1,1
	Абсолютное количество (клеток/µL)	184	2,4
CD45/CD56/CD19/CD3			
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	55,94	1,7
	Абсолютное количество (клеток/µL)	333	0,0
CD19+	% + лимфоциты	19,12	0,6
	Абсолютное количество (клеток/µL)	114	1,3
CD3–CD56+	% + лимфоциты	17,10	1,2
	Абсолютное количество (клеток/µL)	102	0,3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1a. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios в сравнении с селекцией вручную проточного цитометра Cytomics FC 500

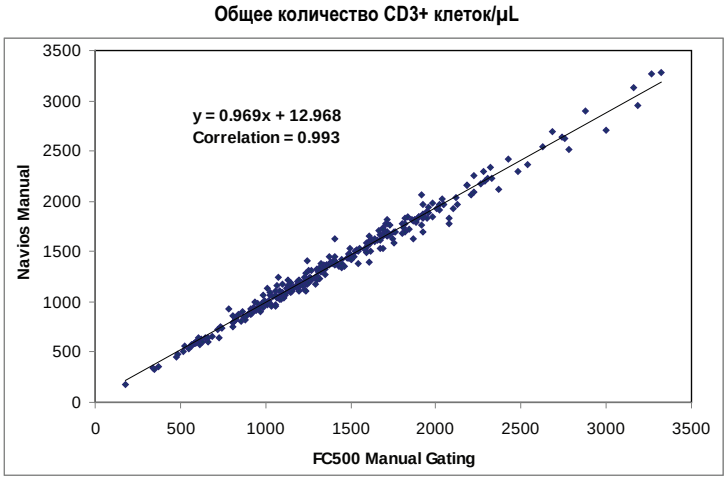
CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 (n=290)					
	Среднее FC 500	**Среднее Navios**	**Корреляция**	**Угловой коэффициент**	**Пересечение**
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	76,69	75,96	0,987	1,010	-1,472
CD3+CD4+	31,47	31,39	0,997	0,984	0,408
CD3+CD8+	43,50	42,67	0,997	0,999	-0,792
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1 415	1 382	0,993	0,969	12,968
CD3+CD4+	591	584	0,996	0,983	3,091
CD3+CD8+	794	765	0,996	0,968	-0,719
CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (n=294)					
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	76,47	75,99	0,991	1,004	-0,742
CD19+	12,10	12,08	0,995	1,000	-0,016
CD3–CD56+	8,11	8,04	0,987	0,986	0,048
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1 417	1 406	0,992	0,994	-1,017
CD19+	229	228	0,995	1,012	-2,973
CD3–CD56+	146	145	0,988	0,980	1,195

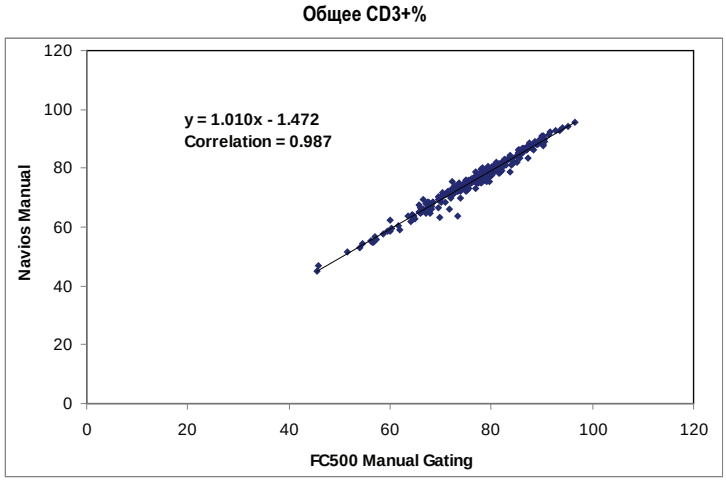
Таблица 1b. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios в сравнении с проточным цитометром Cytomics FC 500 с программным обеспечением tetraCXP

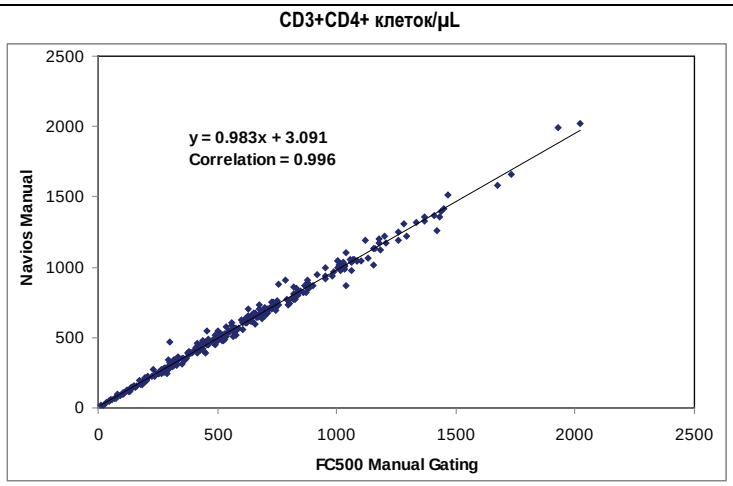
CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 (n=287)					
	Среднее FC 500	**Среднее Navios**	**Корреляция**	**Угловой коэффициент**	**Пересечение**
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	77,95	75,98	0,982	0,988	-1,022
CD3+CD4+	31,35	31,07	0,996	0,980	0,448
CD3+CD8+	44,64	43,02	0,996	0,987	-0,978
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1 366	1 383	0,988	1,001	17,487
CD3+CD4+	562	579	0,994	1,034	2,755
CD3+CD8+	772	771	0,992	0,995	3,559
CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 (n=287)					
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	78,00	76,19	0,988	0,999	-1,712
CD19+	12,04	12,03	0,994	1,000	-0,012
CD3–CD56+	7,87	7,96	0,987	0,996	0,133
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1 374	1 415	0,989	1,029	1,754
CD19+	217	228	0,994	1,033	4,095
CD3–CD56+	136	145	0,989	1,049	2,189

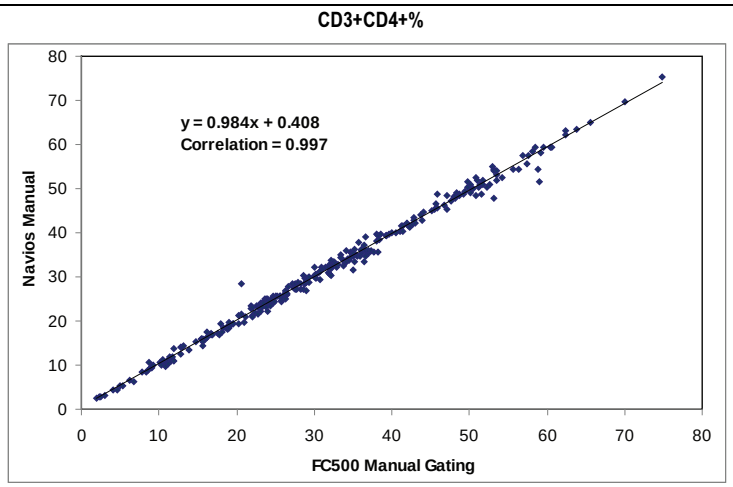
Рисунки 6a и 6b. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios в сравнении с селекцией вручную проточного цитометра Cytomics FC 500

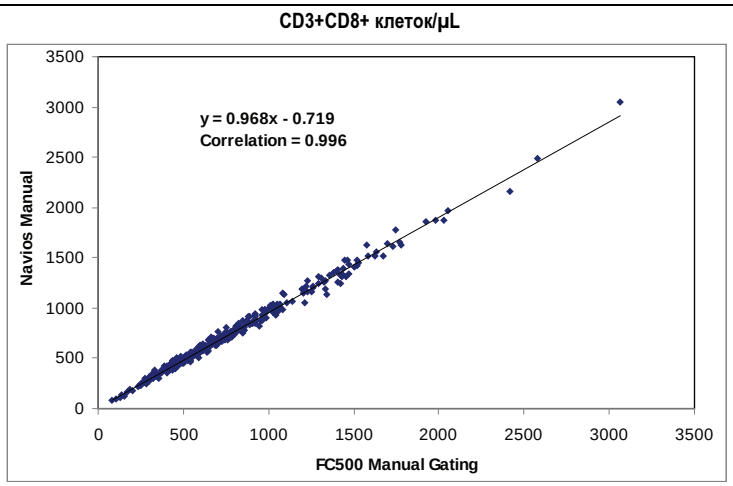
6a. CD45/4/8/3:

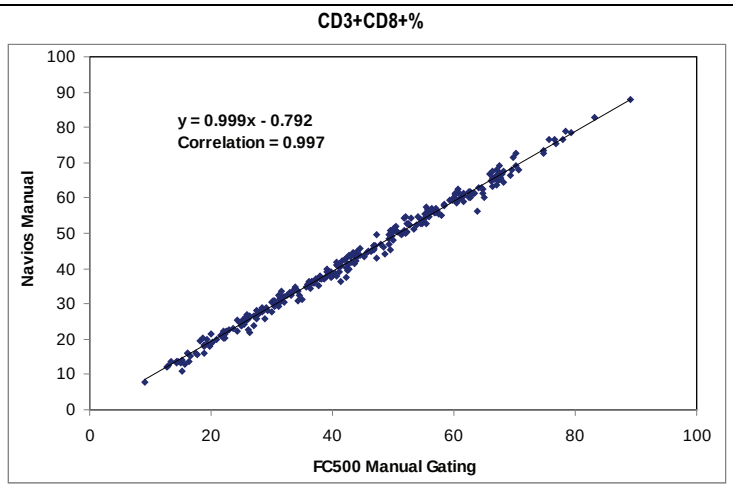






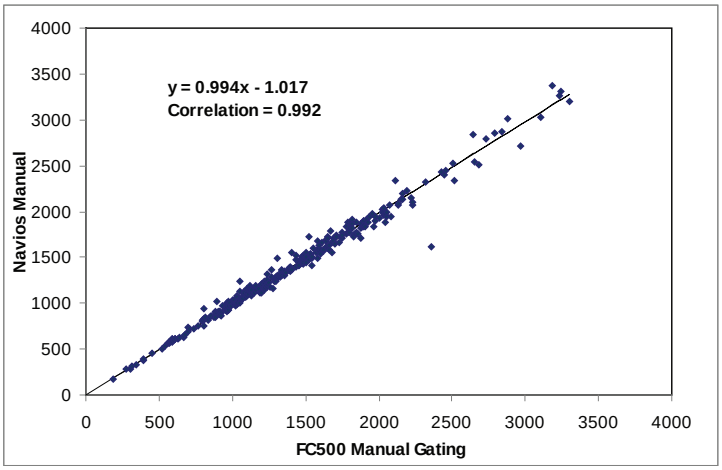




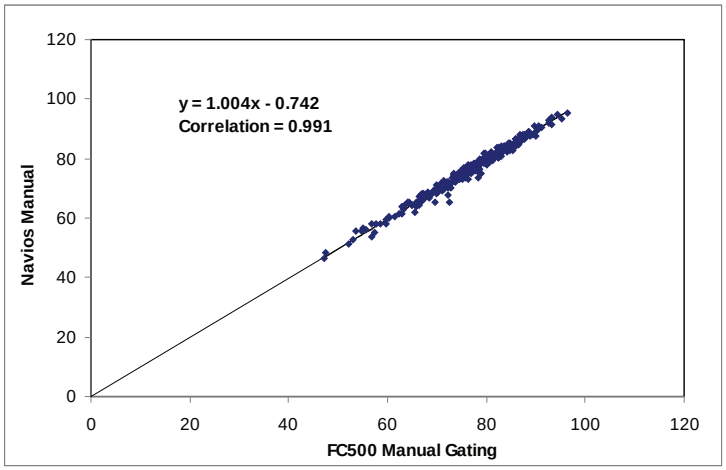


6b. CD45/56/19/3:

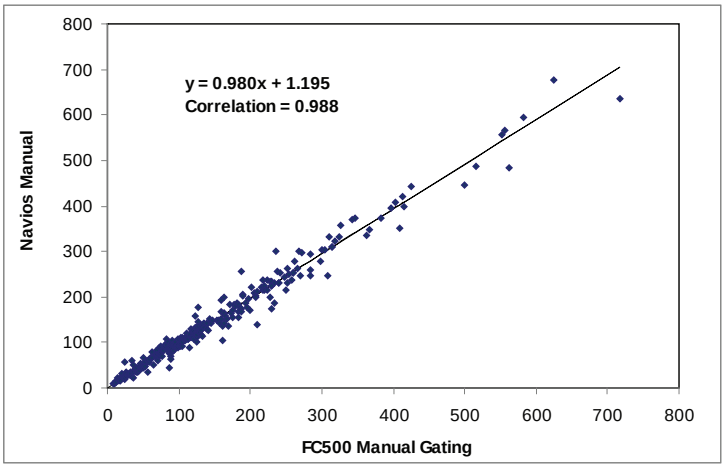
Общее количество CD3+ клеток/µL



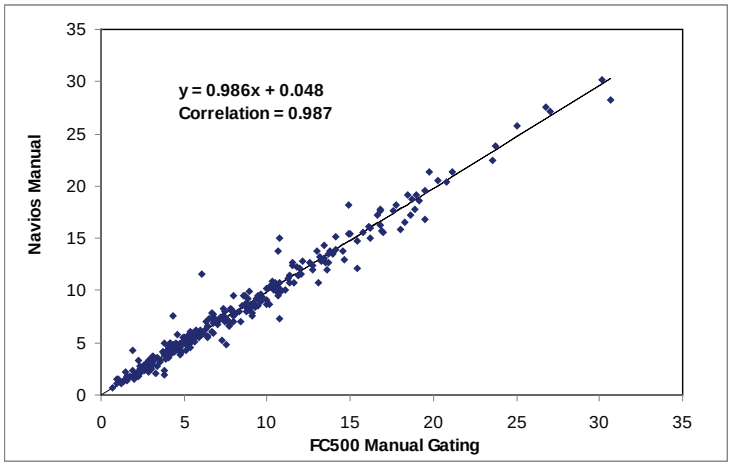
Общее CD3+%



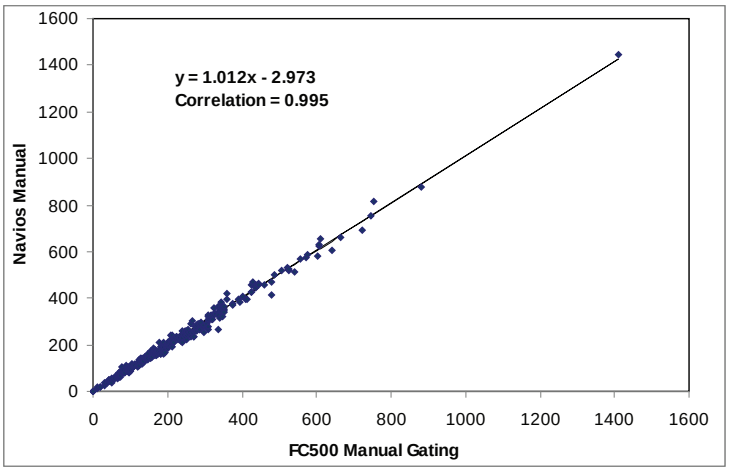
CD3–CD56+ клеток/µL



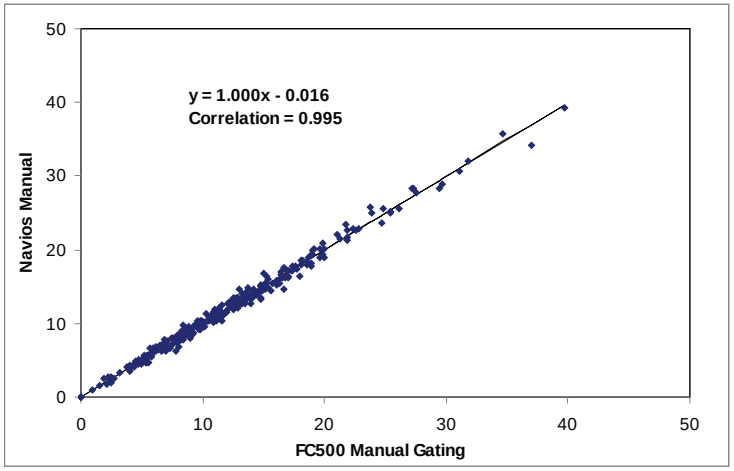
CD3–CD56+%



CD19+ клеток/µL

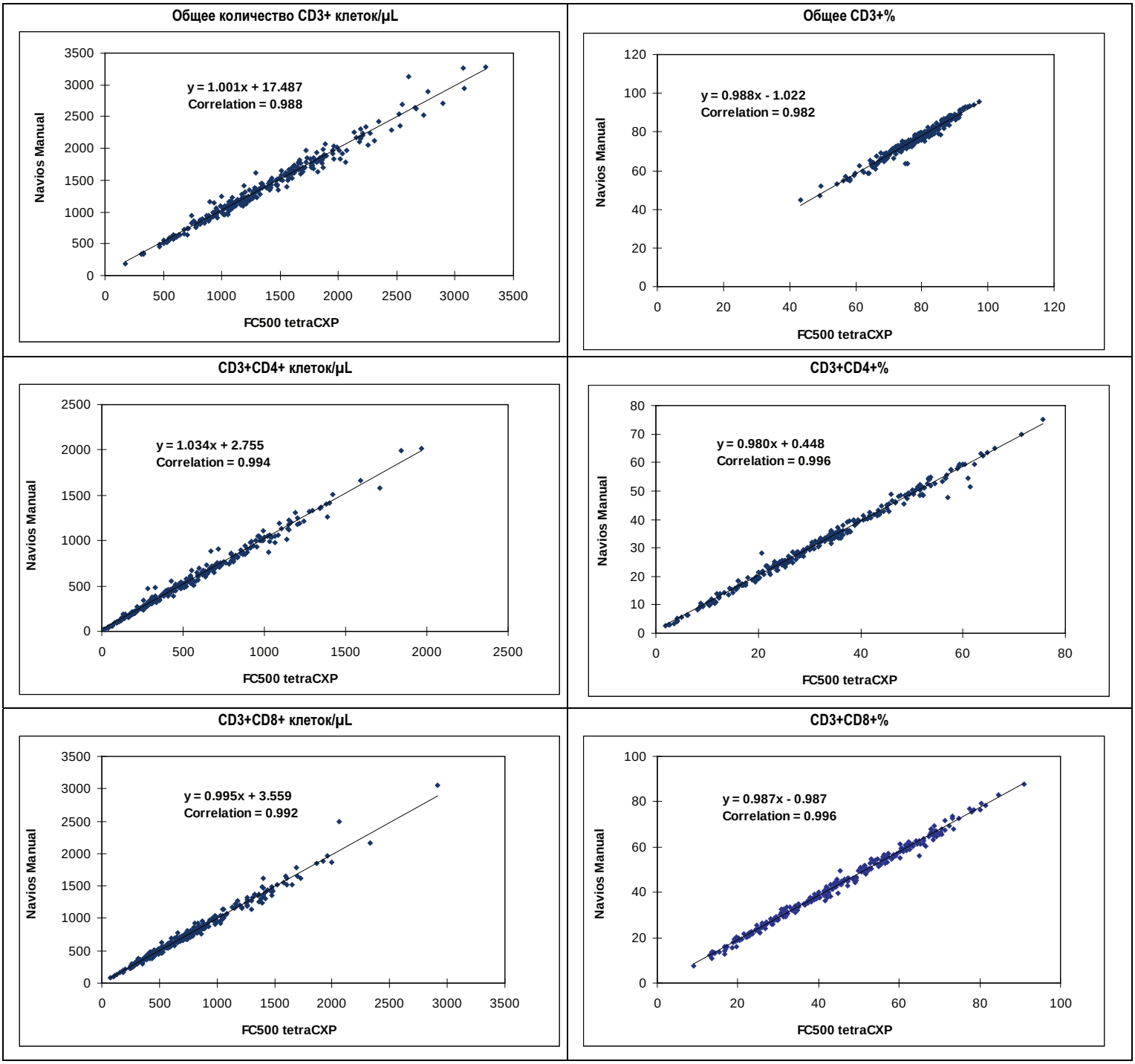


CD19+%

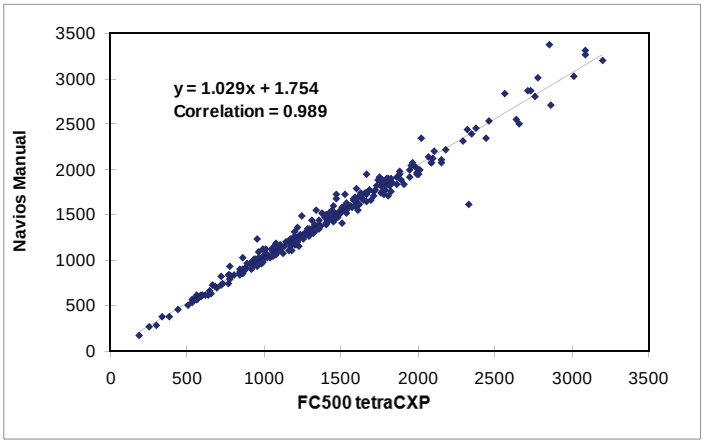


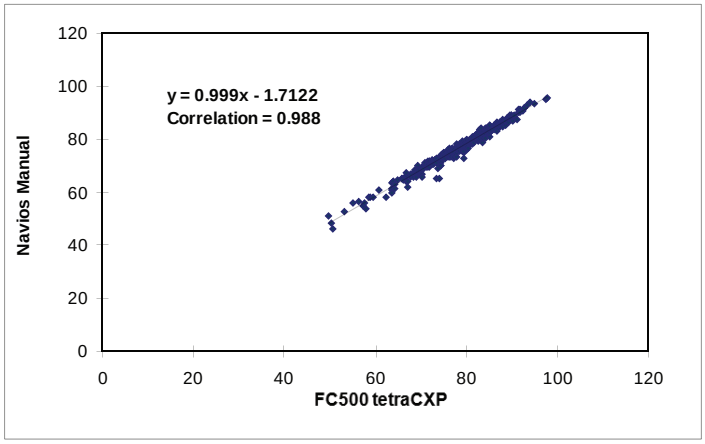
Рисунки 7a и 7b. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios в сравнении с проточным цитометром Cytomics FC 500 с программным обеспечением tetraCXP

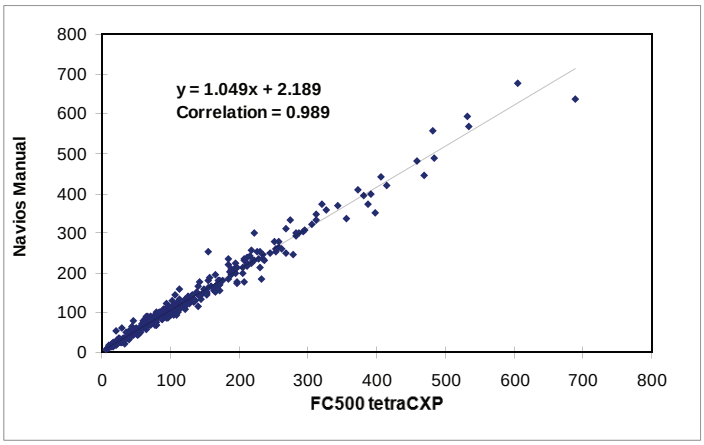
7a. CD45/4/8/3:

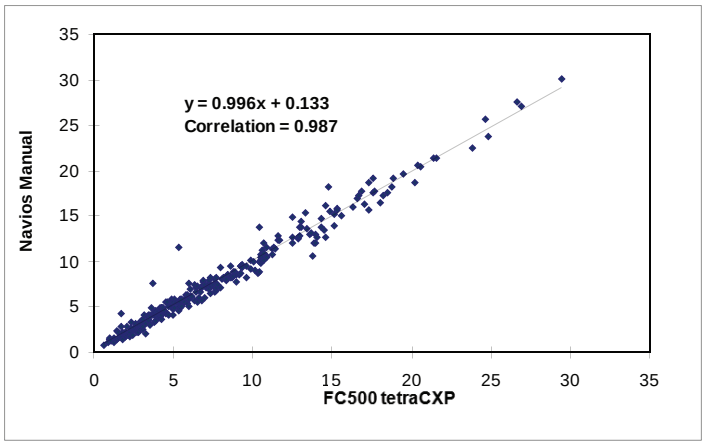


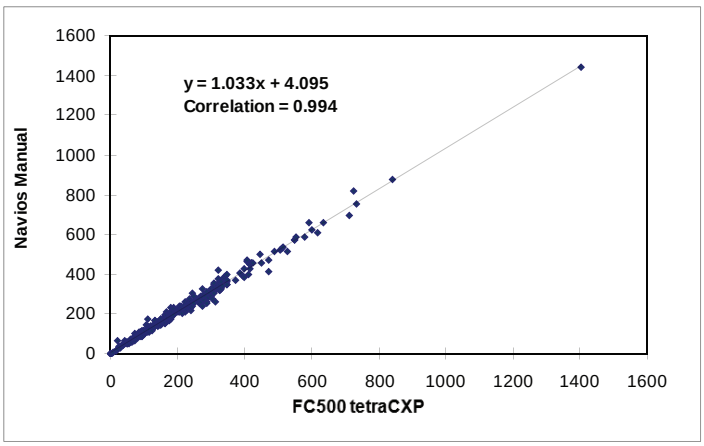
7b. CD45/56/19/3:











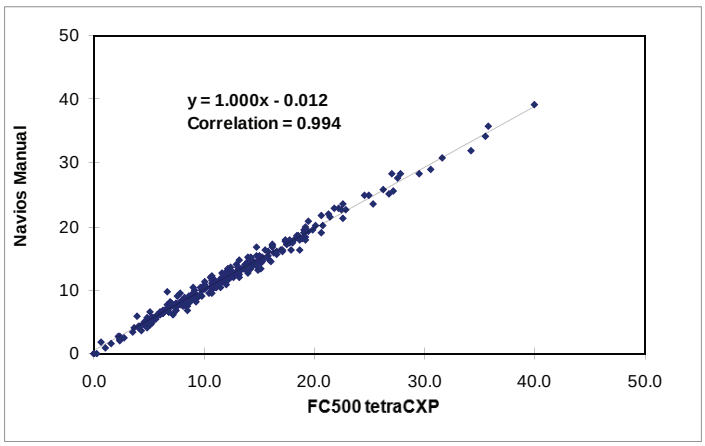
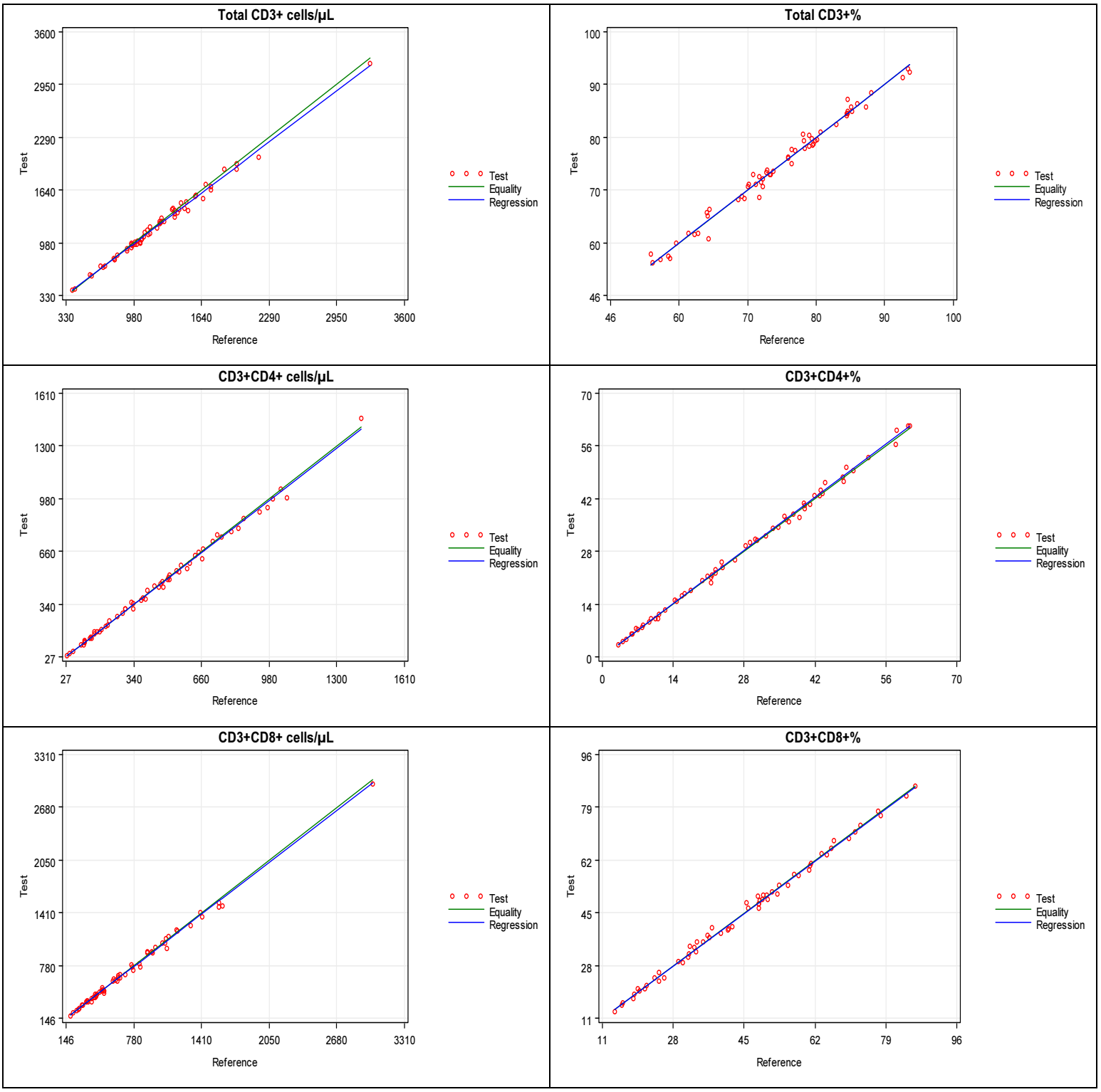


Таблица 2. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios EX в сравнении с селекцией вручную проточного цитометра Navios

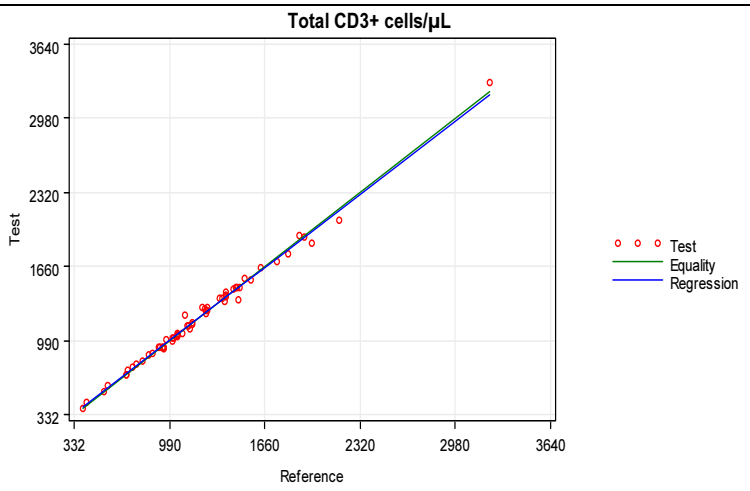
CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (n=60)					
	Среднее Navios	**Среднее Navios EX**	**Корреляция**	**Угловой коэффициент**	**Пересечение**
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	74,48	74,46	0,992	1,003	-0,263
CD3+CD4+	28,04	28,30	0,999	1,006	0,086
CD3+CD8+	44,56	44,40	0,998	0,993	0,151
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1222	1203	0,996	0,967	20,237
CD3+CD4+	454	450	0,998	0,988	2,419
CD3+CD8+	740	727	0,998	0,990	-3,374
CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (n=59)					
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	74,20	74,27	0,995	1,000	0,081
CD19+	13,24	13,44	0,996	1,007	0,097
CD3–CD56+	8,59	8,36	0,996	0,987	-0,119
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1208	1209	0,997	0,986	17,260
CD19+	226	231	0,997	1,036	-2,502
CD3–CD56+	136	132	0,994	0,963	0,666

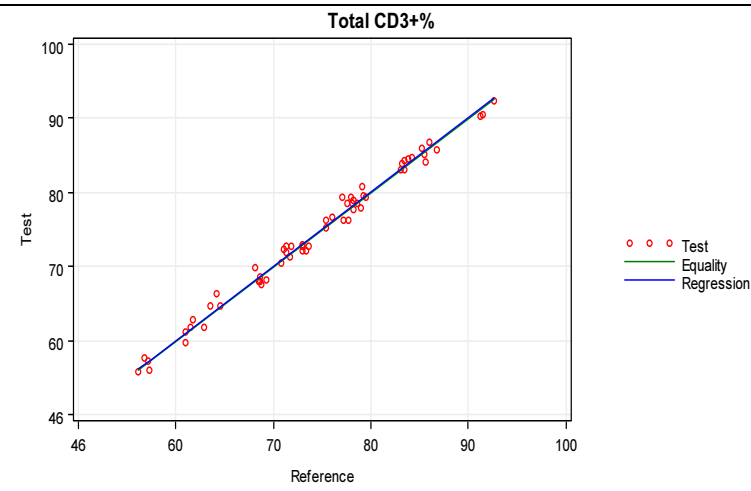
Рисунки 8a и 8b. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios EX в сравнении с селекцией вручную проточного цитометра Navios

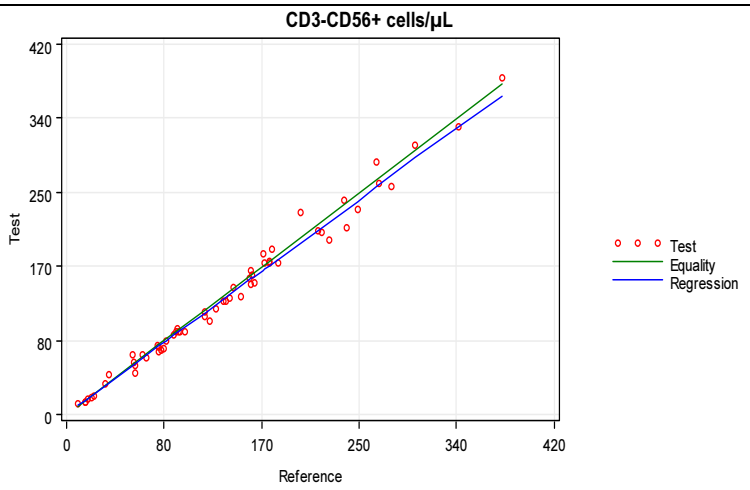
8a. CD45/4/8/3:

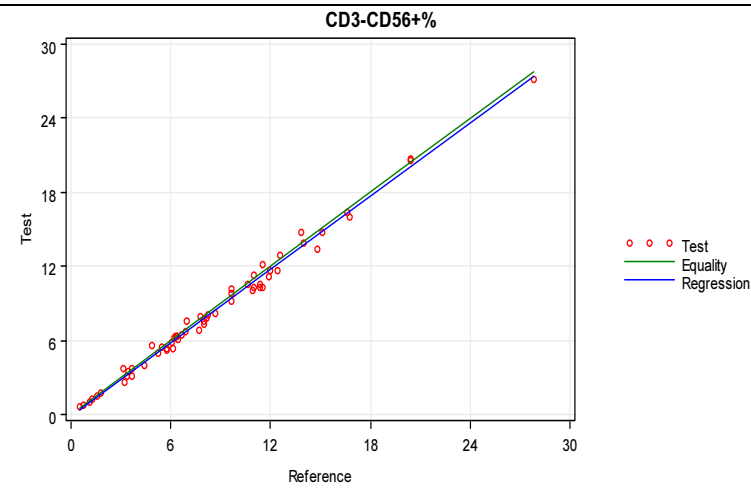


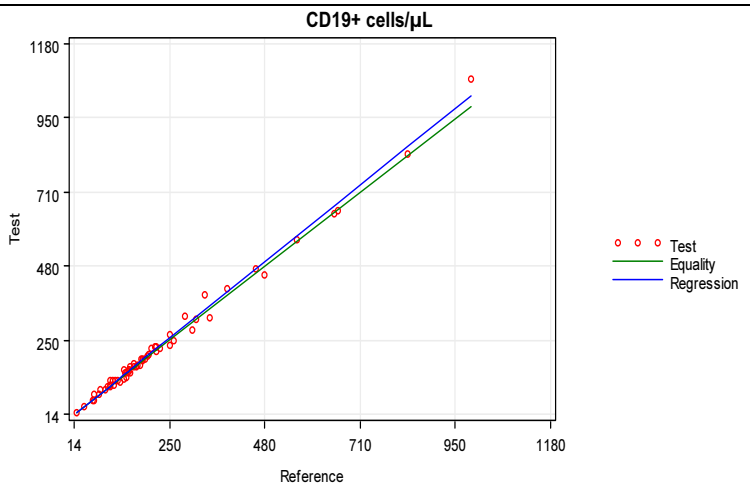
8b. CD45/56/19/3:











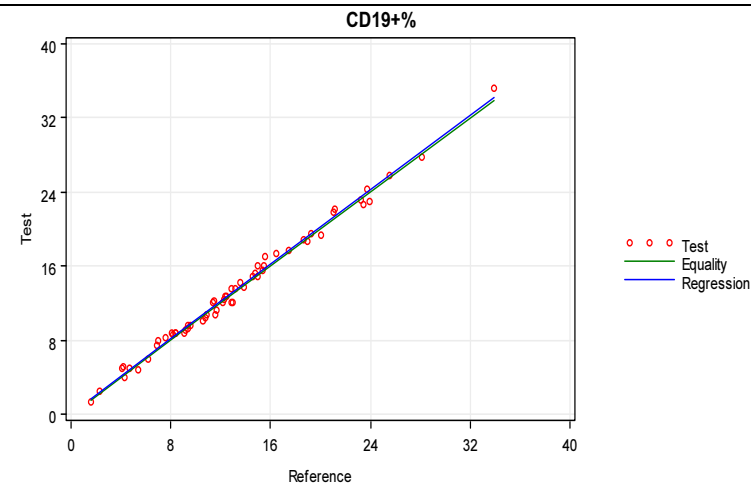


Таблица 3a. Проточный цитометр Navios, ожидаемые значения: CD45/CD4/CD8/CD3

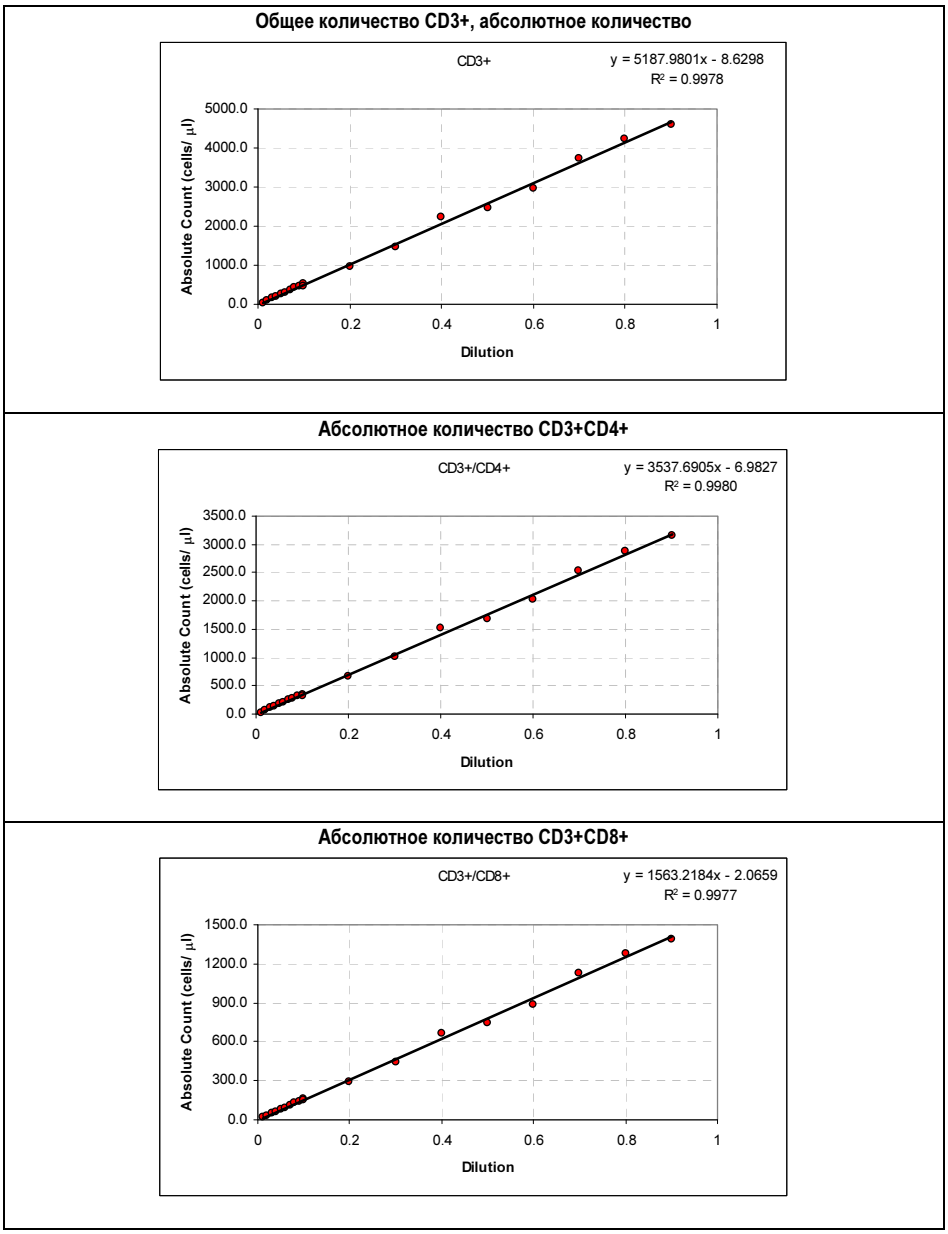
Параметр	Единицы измерения	n	Среднее значение	Нижний предел	Верхний предел
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	144	73,58	57,89	87,13
Общее количество CD3+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	1 458	668	2 291
CD3+CD4+	% + лимфоциты	144	48,31	28,37	64,64
CD3+CD4+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	956	433	1 692
CD3+CD8+	% + лимфоциты	144	23,92	11,83	40,05
CD3+CD8+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	476	147	1 068

Таблица 3b. Проточный цитометр Navios, ожидаемые значения: CD45/CD56/CD19/CD3

Параметр	Единицы измерения	n	Среднее значение	Нижний предел	Верхний предел
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	144	73,49	57,57	86,77
Общее количество CD3+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	1 476	754	2 428
CD19+	% + лимфоциты	144	13,38	4,24	24,98
CD19+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	269	79	574
CD3–CD56+	% + лимфоциты	144	9,79	2,44	25,79
CD3–CD56+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	193	38	561

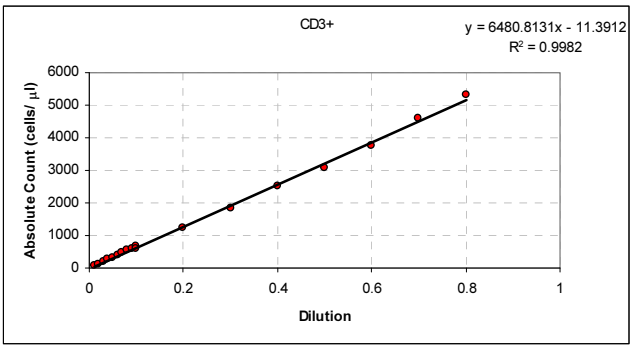
Рисунки 9a и 9b. Линейность селекции вручную проточного цитометра Navios
ПРИМЕЧАНИЕ. Полученные значения приведены в виде абсолютных значений (клеток/µL).

9a. CD45/4/8/3:

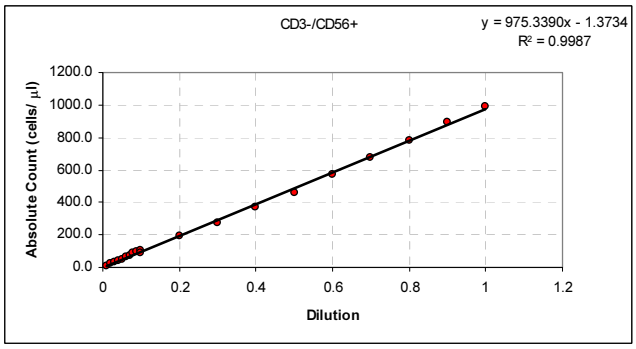


9b. CD45/56/19/3:

Общее количество CD3+, абсолютное количество



Абсолютное количество CD3–CD56+



Абсолютное количество CD19+

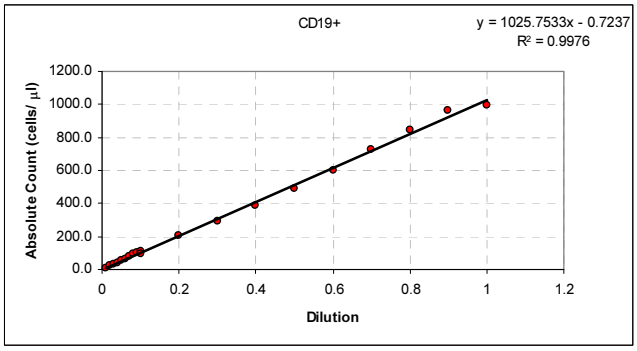


Таблица 4. Диапазоны аналитических измерений Navios

tetraCHROME	Параметры	Единицы измерения	Диапазоны аналитических измерений Navios	Диапазоны аналитических измерений Navios EX
CD45/4/8/3	Общее количество CD3+	клеток/µL	65–4 500	65–3200
	CD3+CD4+	клеток/µL	35–3 000	35–2000
	CD3+CD8+	клеток/µL	15–1 300	15–2000
CD45/56/19/3	Общее количество CD3+	клеток/µL	65–4 500	65–3200
	CD3–CD56+	клеток/µL	35–900	35–650
	CD19+	клеток/µL	35–900	35–900

ССЫЛКИ

1. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF and Todd RF, eds. Leukocyte Typing V. Oxford, UK: Oxford University Press, 1995, Vol. 1. pp. 262, 263, 268, 270, 507-511; Vol. 2. pp. 1398-1400.
2. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. Leukocyte Typing. Springer-Verlag, New York; 1984, pp. 28, 41-42, 44,196.
3. McMichael AJ, ed. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, 1987, pp. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 170-172, 176, 199, 202, 206, 302-308, 315, 475, 796-801.
4. Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le J-M, Tantravahi R, and Ritz J. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. Experimental Hematology, 1996, 24:406-415.
5. Foon KA and Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood, 1986, 68:1-31.
6. Newman, W Targan SF, and Fast LD. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. Mol Imm, 1984, 21:1113-1121.
7. Coffman RL and Weissman IL. B220: A B cell specific member of the T-200 glycoprotein family. Nature, 1981, 289:681-693.
8. Dalchau R and Fabre JW. Identification with a monoclonal antibody of predominantly B lymphocyte specific determinant of the human leucocyte common antigen. J Exp Med, 1980, 153:753-757.
9. Omary MB, Trowbridge IS and Battifora HA. Human homologue of murine T-200 glycoprotein. J Exp Med, 1980, 152:842-852.
10. Dalchau R, Kirkley J and Fabre JW. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte common (L-C) antigen of rat. Eur J Immunol, 1981, 10:737-744.
11. Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, and von dem Borne AEGKr., eds. Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens. Oxford, UK: Oxford University Press, 1989, pp. 536, 541, 699-702.
12. Reinherz EL and Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell, 1980, 19:821-827.
13. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell, 1982, 30:735-743.
14. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature, 1983, 303:808-810.
15. Reinherz EL, Meuer SC, and Schlossman SF. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunology Today, 1983, 4:5-8.
16. Reinherz EL, Morimoto C, Fitzgerald KA, Hussey RE, Daley JF, and Schlossman SF. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J Immunol, 1982, 128:463-468.
17. de Martini RN and Parker JW. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal, 1989, 3:56-70.
18. Caligiuri M, Murray C, Buchwald D, Levine H, Cheney P, Peterson D, Komaroff AL and Ritz J. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. J Immunol, 1987, 139:3306-3313.
19. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Samoza C, Williams AF eds. The Leucocyte Antigen Facts Book. London: Academic Press, 1993, pp. 106-109.
20. Tedder TF and Isaacs CM. Isolation of a cDNA encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes: a new member of the immunoglobulin superfamily. J Immunol, 1989, 143:712-717.
21. Griffin JD, Hercend T, Beveridge RP, and Schlossman SF. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. J Immunol, 1983, 130:2947-2951.
22. Hercend T, Griffin JD, Bensussan A, Schmidt RE, Edson MA, Brennan A, Marray C, Daley JF, Schlossman SF, and Ritz J. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. J Clin Invest, 1985, 75:932-943.
23. Schmidt RE, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, and Ritz J. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. J Exp Med, 1986, 164:351-356.
24. Schmidt RE, Michon JM, Woronicz J, Schlossamn SF, Reinherz EL, and Ritz J. 1987. Enhancement of natural killer function through activation of the T11 E rosette receptor. J Clin Invest 79:305-308.
25. Benjamini E and Leskowitz S. Immunology: A Short Course. Second Edition. New York: Wiley-Liss, 1991, 211-244.
26. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol, 1980, 125:1269-1274.
27. Felsenstein D, Carney WP, Lacoviello VR and Hirsch MS. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus induced mononucleosis. J Infect Dis, 1985, 152:198-203.
28. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun, 1983, 40:472-477.
29. Goldstein G, Lifter J and Mittler R. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Fabre JW, eds. New York, NY: Academic Press, 1982, pp. 39-70.
30. Schmidt RE: Monoclonal antibodies for diagnosis of Immunodeficiencies. Blut, 1989, 59:200-206.
31. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood, 1989, 74:2203-2211.
32. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, Van Leeuwen E, Capel PJA and Haanen C. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WTI-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood, 1989, 74:1152-1158.
33. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation, 1989, 47:465-471.
34. Fauci AS: The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science, 1988, 239:617-622.
35. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. Adv Immunol, 1989, 47:187.
36. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV: CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS, 1989, 2:114-124.
37. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. MMWR, 2003: 52 (No. RR-2):1-13.
38. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Edition (H3). Clinical and Laboratory Standards Institute.
39. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry, 1990, 11:453-459.
40. Nicholson JKA, Hubbard M and Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry), 1996, 26:16-21.
41. Cosimi AB, Colvin RB, Burton RC, Rubin RH, Goldstein G, Kung PC, Hansen WP, Delmonico FL and Russell PS. 1981. Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. N. Engl. J. Med., 305:308-314.
42. Kaufman A, Herold KC. Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 2009 May; 25(4):302-6.
43. Frankel AE, Zuckero SL, Mankin AA, Grable M, Mitchell K, Lee YJ, Neville DM,Woo JH. Anti-CD3 recombinant diphtheria immunotoxin therapy of cutaneous T cell lymphoma. Curr Drug Targets. 2009 Feb; 10(2):104-9.
44. Koepke JA and Landay AL. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol, 1989, 52:19-27.
45. Brunetta E, Hudspeth KL, Mavilio D. Pathologic Natural Killer Cell Subset Redistribution in HIV-1 infection: New Insights in Pathophysiology and Clinical Outcomes. Journal of Leukocyte Biology 2010;88 (Epub ahead of print 07/22/2010).
46. Alter G, Malenfant JM, Delabre RM, Burgett NC, Yu XG, Lichterfeld M, Zaunders J, Altfeld M. Increased Natural Killer Cell Activity in Viremic HIV-1 Infection. The Journal of Immunology 2004(173):5305-5311.
47. CDC: 1997 Revised Guidelines for Performing CD4+ T-Cell Determinations in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). MMWR 1997; 46 (RR-2); 1-29.
48. H42-A2 CLSI: Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry: Approved Guideline – 2nd Edition 2007.
49. Zloza, et al. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. Journal of Leukocyte Biology 2006:79(4-6).
50. EP06-A CLSI: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline.
51. EP28-A3c CLSI: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, Third Edition.
52. EP09-A2 CLSI: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline.
53. EP17-A CLSI: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline.
54. EP09-A3 CLSI: Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-Third Edition.

ПРЕДЛАГАЕМАЯ ПРОДУКЦИЯ

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

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

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

За дополнительной информацией или при получении поврежденной продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821, U.S.A.
www.beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Тел.: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Редакция AB, 04/2017

Изменения были внесены в:

- НАЗНАЧЕНИЕ
- ПРИНЦИПЫ ТЕСТА
- Таблица 4. Диапазоны аналитических измерений Navios

Редакция AC, 09/2017

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки

Редакция AD, 12/2018

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- Удалено (COULTER EPICS XL/XL-MCL)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5

REF 6607015 -50 тестов

Ч.№ 4238013-HD

CE BECKMAN COULTER

	CD45-FITC	CD4-RD1	CD3-PC5
Специфичность	CD45	CD4	CD3
Клон	B3821F4A	SFCI12T4D11	UCHT1
Гибридома	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c
Иммуноген	Агент трансфекции, содержащий кДНК CD45 человека	Периферические Т-лимфоциты человека	Тимоциты человека и лимфоциты периферической крови от человека с лейкемией Сезари
Подкласс иммуноглобулина	IgG2b	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость	Специальная среда	Специальная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждается светом длиной волны 468-509 nm/светоизлучает на длине волны 504-541 nm	Возбуждается светом длиной волны 486-580 nm/светоизлучает на длине волны 568-590 nm	Возбуждается светом длиной волны 486-580 nm/светоизлучает на длине волны 660-680 nm
Конъюгат	FITC (Изотиоцианат флуоросцеина)	RD1 (Фикоэритрин)	PC5 (Фикоэритрин-Cy5)
Молярная концентрация	FITC/Белок: 3-10	RD1/Белок: 0,5-1,5	PC5/Белок: 0,5-1,5

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

РЕАГЕНТ ДЛЯ ПОДСЧЁТА КЛЕТОК ДЛЯ ПРОТОЧНЫХ ЦИТОМЕТРОВ COULTER EPICS

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 является трёхцветным реагентом, содержащим три мышиных моноклональных антитела. Все три антитела помечены флуорохромами разных цветов. Этот реагент позволяет одновременно провести идентификацию и подсчёт общего количества CD3+ и CD4+ и соотношения CD3+/CD4+ лимфоцитов при проточной цитометрии цельной крови.[1-3] CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 в качестве изотипического контроля используется для отслеживания неспецифического связывания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов периферической крови состоит из клеток трёх типов: Т (происходящие из тимуса), В (происходящие из костного мозга) и нулевые клетки.[4] Эти типы клеток при изучении микроскопией морфологически неотличимы, но могут быть идентифицированы по специфическим антигенным отличиям клеточных мембран.

Т и В лимфоциты играют главную роль в работе иммунной системы. Различные подтипы Т-лимфоцитов могут распознавать специфические антигены, функционировать как клетки-эффекторы и/или контролировать как тип, так и интенсивность клеточного и/или гуморального иммунного ответа. При активации антигеном или макрофагом посредством Т-лимфоцита, отдельные В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые синтезируют и выделяют специфические иммуноглобулины (Ig).

В прошлом Т и В лимфоциты идентифицировались и подсчитывались с исользованием таких клеточных маркеров, как рецептор к эритроцитам барана на Т-лимфоцитах (Е-розеток) и поверхностный мембранный иммуноглобулин (Sm) Ig на В-лимфоцитах.[5,6] Хотя методика Е-розеток специфична для Т-лимфоцитов, её применение ограничивает то, что визуальная идентификация и самостоятельный подсчёт комплексов Т-лимфоцитов с овечьими эритроцитами возможны только через оптический микроскоп. Измерение SmIg для идентификации и посчёта В-лимфоцитов же ограничено тем, что другие клеточные популяции могут экспрессировать SmIg и/или связывать иммуноглобулин за счёт рецепторов к его Fc-фрагменту, что приведёт к ложнопозитивному результату.

Позднее были созданы моноклональные антитела для идентификации и подсчёта Т и В лимфоцитов.[6,7] В отличие от относительно неспецифичных поликлональных антител (гетероантисыворотки) к этим клеточным популяциям, моноклональные антитела связывают отдельные специфические поверхностные антигены Т и В клеток. Это позволяет не только более точно и аккуратно подсчитать лимфоциты, но и, используя другие клеточные маркеры (TdT, антиген, относящийся к HLA-D, SmIg), идентифицировать различные стадии дифференцировки Т и В клеток.

Различные поверхностные антигены экспрессируются и исчезают на Т и В лимфоцитах в зависимости от стадии их созревания (дифференцировки) и/или функционального состояния клеток. Начав экспрессировать антиген, клетка может коэкспрессировать один или несколько из этих антигенов в течение различных периодов времени.

Экспрессия Т-лимфоцитами общих для Т-клеток поверхностных антигенов происходит в следующем порядке: CD7 (ранние протимоциты); CD2 (промежуточные протимоциты); CD5 (незрелые тимоциты), цитоплазматический CD3 (незрелые и обыкновенные тимоциты) и CD3 (зрелые тимоциты).[3,7] Затем начинается коэкспрессия (обыкновенными тимоцитами) и специализированная экспрессия (зрелыми тимоцитами) CD4 (индукторы) и CD8 (супрессоры/цитотоксические клетки).[3,7] CD7, CD2, CD5 и CD3 продолжают коэкспрессироваться с CD4 или CD8 в течение всего процесса дифференцировки Т-лимфоцитов, в том числе на покоящихся и активированных зрелых Т-лифоцитах периферической крови или лимфоидной ткани.

Экспрессия В-лимфоцитами общих для В-клеток поверхностных антигенов происходит в следующем порядке: CD19 (коммитированные предшественники В-клеток/про-В клетки); CD20 (ранние пре-В клетки).[3,7,8] CD19 и CD20 продолжают коэкспрессироваться в течение всего процесса дифференцировки В-лимфоцитов, в том числе и на покоящихся и активированных зрелых В-лифоцитах периферической крови или лимфоидной ткани. Оба антигена изчезают на последней стадии дифференцировки В-лимфоцитов, стадии плазматической клетки.

CD21 (покоящиеся зрелые В-лифоциты периферической крови или лимфоидной ткани) и CD22 (пре-В клетки) являются поверхностными антигенами В-клеток, изчезающими при активации зрелых В-лифоцитов периферической крови или лимфоидной ткани[3,8] Поверхностной экспрессия CD22 предшествует цитоплазматическая экспрессия CD22 (про-В клетки).

Реагенты со специфическими моноклональными антителами, связывающими поверхностные антигены, общие для Т или В клеток, могут быть использованы для идентификации или подсчёта зрелых Т или В лимфоцитов, соответственно. Реагенты со специфическими моноклональными антителами к определённым поверхностным антигенам также могут быть использованы для определения стадии созревания (дифференцировки) и/или функционального состояния клеток. Данный тест использует моноклональные антитела CD3, CD4, и CD45 для идентификации или подсчёта зрелых Т-лимфоцитов и Т-супрессоров/цитотоксических Т-лимфоцитов за счёт специфического связывания поверхностных антител, общих для Т-лимфоцитов и Т-супрессоров/цитотоксических Т-лимфоцитов, CD3 и CD4, соответственно. Кроме того, тест позволяет одновременно исследовать различные популяции лимфоцитов в одной пробе цельной крови, используя только один реагент.

CD45

Антитело CD45 распознаёт представителей семьи общих лейкоцитарных антигенов CD45 с молекулярной масой в 180, 190, 210 и 220 kd.[3,9,10] Он известен также как общий лейкоцитарный антиген (LCA). CD45 экспрессируется на всех гемопоэтических клетках, за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников.[11,12] Он не был обнаружен в дифференцированных негемопоэтических тканях.[11-14]

CD4

Антиген CD4 имеет молекулярную массу в 62 kd.[3,15] Он экспрессируется на популяции Т-индукторов периферической крови.[15,16] Кроме того, в небольших количествах, он экспрессируется на моноцитах.[17] CD4+ лимфоциты играют важную роль в регуляции иммунного ответа.[18,19] В периферической крови CD4+ лимфоциты выполняют функцию индукторов для вздаимодействий Т клеток между собой, с В-клетками и с макрофагами.[20] CD4 связывается с антигеном главного комплекса гистосовместимости II класса (MHC) на клетках-мишенях.[15,20]

CD3

Антитело к CD3 антигену спефически связывается с эпсилон-цепью CD3 компонента комплекса Т-клеточного рецептора (TCR).[3,21] Молекулярная масса этой цепи составляет 20 kd.[21] Это специфический для клеточной линии общий для Т-клеток антиген, в норме экспрессирующийся на поверхности зрелых тимоцитов и на покоящихся и активированных зрелых Т-лимфоцитах периферической крови (как в популяциях индукторов, так и супрессоров и цитотоксических клеток).[22-24]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

CD3+ и/или CD4+ лимфоциты

Процент CD3+ и/или CD4+ лимфоцитов и их абсолютное количество могут быть использованы при оценке иммунного статуса, связанного с известными или неизвестными заболеваниями, и для контроля уровня лимфоцитов после трансплантации органов.[25-32]

К примеру, выявление аномальных уровней CD3+ и/или CD4+ лимфоцитов может помочь при диагностировании и/или прогнозировании различных аутоиммунных заболеваний, связанных с изменением количества белых клеток крови. Изменение процента CD3+ и/или CD4+ лимфоцитов, замеченное после трансплантации органа (к примеру, почки), указывает на то, что измерение количества CD3+ и/или CD4+ лимфоцитов может оказаться полезным для отслеживания изменений в этих клеточных популяциях.

Идентификация аномальных уровней CD4+ лимфоцитов может также помочь при диагностировании и/или прогнозировании иммунодефицитных состояний. Например, при заражении вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), этиологический фактор синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД) приводит к глубокой иммунносупрессии, в основном за счёт выборочного истощения популяции CD4+ лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к вирусу (антиген CD4).[17,33] Прогрессирующее клиническое и иммунологическое ухудшение обычно коррелирует с падением числа CD4+ лимфоцитов.[17]

Соотношение T4/T8

Изменения уровней CD4+ и/или CD8+ лимфоцитов, связанное с заболеваниями, может изменить T4/T8 соотношение числа индукторов: супрессоров/цитотоксических клеток. Поэтому соотношение T4/T8 может оказаться полезным при диагностировании и/или прогнозировании в качестве индикатора состояния иммунного ответа организма.

Соотношение T4/T8 вместе с числом CD4+ лимфоцитов широко использовались в качестве лабораторных параметров для оценки комплекса, связанного со СПИДом и собственно СПИДом.[17,34] У пациентов на продвинутой стадии СПИДа соотношение T4/T8 стремится к нулю, а наличие CD4+ лимфоцитов не регистрируется.[17] При этом уровень CD8+ лимфоцитов может быть нормальным, повышенным или пониженным.

У пациентов со стабильной функцией почечного аллотрансплантата после трансплантации наблюдается пониженный процент CD4+ и повышенный процент CD8+ лимфоцитов без значимого изменения соотношения T4/T8.[6] Кроме того, низкое соотношение T4/T8 и пониженный процент CD4+ лимфоцитов наблюдался у пациентов во время фенотипического восстановления после аутологичной трансплантации очищенного костного мозга.[30,31]

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Этот тест основан на способности моноклонального антитела связываться с поверхностью клеток, экспрессирующих определённые антигенные детерминанты. CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 является комбинацией трёх мышиных моноклональных антител, специфичных к разным поверхностным антигенам. Специфическая окраска клеток достигается за счёт инкубации цельной крови с трёхцветным реагентом CYTO-STAT triCHROME. Вторая идентичная проба крови метится изотипическим контролем CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 для оценки неспецифической фоновой флуоресценции. Красные клетки крови подвергаются лизису, а оставшиеся белые клетки крови анализируются с помощью проточной цитометрии с использованием селекторов лимфоцитов. На первой гистограмме селектор лимфоцитов определяется как содержащий яркую CD45+ FITC флуоресценцию и низкое боковое рассеяние (SS). На второй гистограмме процент положительно-окрашенных клеток определяется для четырёх квадрантов: CD3-/CD4+ (только положительная RD1 флуоресценция), CD3+/CD4+ (положительная PC5/RD1 флуоресценция), CD3-/CD4- (отрицательная PC5/RD1 флуоресценция) и CD3+/CD4- (только положительная PC5 флуоресценция).

РЕАГЕНТ

Смотрите таблицу странице 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Кроме антител, в состав реагентов входят 0,2% БСА, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com.***

1. Этот реагент содержит 0,1% азида натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. Во время утилизации соединения азида следует смывать проточной водой. Рекомендуется соблюдение этих предосторожностей для избежания образования отложений в металлических трубах, что может создавать взрывоопасные условия. При попадании в глаза или на кожу, тщательно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми материалами, с ними соприкасающимися, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
3. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта проб с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не используйте антитело после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.
5. Минимизируйте воздействие света на реагент при хранении или инкубации.
6. Избегайте бактериального загрязнения реагентов, так как оно может привести к ошибочным результатам.
7. Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этим реагентом.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Открытый реагент сохраняет стабильность в течение 90 дней после вскрытия при хранении при температуре 2-8°C. Сразу после использования верните реагент к 2-8°C. Не замораживайте. Минимизируйте воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любое внешнее изменение реагента (в норме это прозрачная розовая жидкость) или значительные колебания значений контрольных показателей могут указывать на разрушение реагента, и в таком случае его не следует использовать.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Моноклональное антитело CYTO-STAT triCHROME используется прямо из флакона.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

ВНИМАНИЕ: Стабильность проб крови очень изменчива. Для оптимальных результатов начинайте анализ в течение 6 часов после венепункции. Непомеченная, предохраняемая от свёртывания кровь до начала процедуры должна храниться при температуре 20-25°C. Не охлаждайте.

Заберите венепункцией в асептических условиях пробу венозной крови в пробирку для забора крови, используя соответствующий антикоагулянт (рекомендуется ЭДТА).[38] Для каждого теста требуется 100 µL цельной крови. Заберите достаточно крови (от 1 до 2 mL на пробирку) для проведения тестов и постановки контроля, и храните аутологичную плазму на случай необходимости разведения пробы. Подсчёт белых кровяных клеток и проверка жизнеспособности клеток должны быть проведены, следуя установленной лабораторной процедуре, для каждого образца венозной крови. Рекомендуемая жизнеспособность клеток – ≥ 90%, но её может быть сложно добиться в некоторых аномальных образцах.

ПРОЦЕДУРА ИММУННОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT triCHROME

ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5
REF 6607015 - 50 тестов (0,5 mL)

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Агент лизиса эритроцитов (по требованию).

Система реагентов COULTER IMMUNOPREP для рабочей станции COULTER Q-PREP

Ч.№ 7546946 – 100 тестов

Разбавитель (при необходимости)
аутологичная плазма

ИЛИ

Система реагентов COULTER IMMUNOPREP для:

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

Разбавитель (при необходимости)
аутологичная плазма

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/ MsIgG1-PC5, Ч.№ 6607019 – 50 тестов (0,5 mL)

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

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

COULTER CYTO-TROL Control Cells, Ч.№ 6604248 -50 тестов

Флуоросферы Flow-Count, Ч.№ 7547053 (20 мл) (дополнительный реагент)

тест-пробирки 12 x 75 mm

Пробирки для забора цельной крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Пипетки для переноса

Пастеровские пипетки

Микропипетки

Вихревой смеситель

Проточный цитометр

Счётчик клеток или гемацитометр

Фильтр (для COULTER EPICS XL/XL-MCLтолько с 3 сенсорами флуоресценции), Ч.№ 6915056

ПРОЦЕДУРА

1. Оптимальное мечение достигается при количестве белых клеток крови в пределах 3-10 x 10^3 клеток/µL. Если количество белых

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

клеток крови превышает 10 x 10^3 клеток/µL необходимо разбавление, а при количестве белых клеток крови меньше 3 x 10^3 клеток/µL необходимы центрифугирование и ресуспензирование для получения значений в пределах 3-10 x 10^3 клеток/µL. При использовании систем реагентов COULTER Q-PREP/IMMUNOPREP, COULTER MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP или COULTER TQ-Prep/IMMUNOPREP в качестве разбавителя рекомендуется использовать аутологичную плазму.

Аномальные пробы

a. Большое число белых клеток крови (>10 x 10^3 клеток/µL)
   10-20 x 10^3: Разбавьте кровь 1:2.
   20-30 x 10^3: Разбавьте кровь 1:3.
   30-40 x 10^3: Разбавьте кровь 1:5.
   40-60 x 10^3: Разбавьте кровь 1:6.
   60-100 x 10^3: Разбавьте кровь 1:10.
   100-200 x 10^3: Разбавьте кровь 1:20.
b. Малое количество белых клеток (<3 x 10^3 клеток/µL) – Используйте метод лейкоцитных плёнок
   1) Центрифугируйте кровь при 20-25°C на 500 x g в течение 5 минут.
   2) Отберите лейкоцитную плёнку пастеровской пипеткой, забрав частично красные клетки крови и немного плазмы, чтобы быть уверенным, что все белые клетки крови извлечены.
   3) Полностью ресуспензируйте клетки, несколько раз перемешав пастеровской пипеткой.
   4) Определите концентрацию клеток, используя счётчик клеток или гемацитометр.
   5) Доведите разбавителем концентрацию клеток до 10 x 10^3 клеток/µL.

2. Для каждой пробы промаркируйте тест-пробирки 12 x 75 mm, одну под моноклональные антитела и другую под изотипический контроль. Добавьте в соответственно промаркированную тест-пробирку 10 µL of CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 или CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5.
3. Добавьте в каждую тест-пробирку по 100 µL пробы венозной крови. Следует избегать загрязнения края или стенок тест-пробирок кровью, потому что это может привести к неполному лизису.
4. Аккуратно смешайте, пользуясь вихревым смесителем. Инкубируйте реакционные смеси при 20-25°C в течение 10-12 минут.

ВАЖНО: Если капли реагента остаются у края тест-пробирки, их следует удалить, иначе нелизированные красные кровяные клетки могут загрязнить образец и исказить результаты. Для их удаления можно использовать ватную палочку.

5. Лизируйте красные кровяные клетки в каждой из тест-пробирок, следуя рекомендуемой для выбранного метода лизиса процедуре (система реагентов COULTER Q-PREP/IMMUNOPREP, система реагентов COULTER MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP или система реагентов COULTER TQ-Prep/IMMUNOPREP).
6. Анализируйте клетки на проточном цитометре, приспособленном для анализа многоцветной флуоресценции, правильно выровненном и использующем селектор лимфоцитов в соответствии с приведённой ниже ПРОЦЕДУРОЙ АНАЛИЗА ПРОБ. Для минимизации вероятности получения неоптимальных результатов анализировать меченые клетки следует быстро.
   a. Результаты флуоресцентной проточной цитометрии должны быть нанесены на логарифмическую шкалу.
   b. Значения бокового рассеяния должны быть нанесены на линейную шкалу.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ДЛЯ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизирован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции в соответствии с рекомендациями производителя (за ними обратитесь к руководствам по приборам).

Флуорохромы изотиоцианат флуоросцеина (FITC), фикоэритрин (RD1) и фикоэритрин-Cy5 (PC5) излучают на разных длинах волн, но всё же частично их спектральные диапазоны перекрывают друг друга, что следует откорректировать с помощью электронной компенсации. Оптимальные уровни компенсации можно установить, проанализировав на двухпараметрической диаграмме донорские клетки, по отдельности помеченные каждым флуорохромом. В качестве альтернативы можно пометить клетки CYTO-COMP соответствующими комбинациями флуорохромов из комплекта реагентов CYTO-COMP. В обоих случаях проводится регулировка для того, чтобы гарантировать отсутствие мечения в двухцветном квадранте (квадрант 2) для каждого из флуорохромов. Помеченные CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 COULTER CYTO-TROL Control Cells могут быть использованы для проверки установок компенсации.

Перед тем, как проводить анализ проб, следует пометить контрольные пробы (например, COULTER CYTO-TROL Control Cells) для проверки реактивности антител.

Специфическое и/или неспецифическое связывание Fc-фрагмента антител с моноцитами и гранулоцитами пробы можно исключить с помощью правильной настройки селектора лимфоцитов на проточном цитометре.[39] Лимфоциты определяются как обладающие яркой CD45+ флуоресценцией и низким боковым рассеянием.[40]

Изотипический контроль CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 используется для определения положения курсора для учёта неспецифического связывания Fc–фрагмента с лимфоцитами пробы. Курсоры располагаются так, чтобы включить 98% (номинально) неспецифической флуоресценции в 3 квадрант. Неспецифическая флуоресценция в квадрантах 1, 2 и 4 для любой контрольной пробы обычно ограничивается 2 или менее процентами у здоровых представителей (если это значение казывается выше 2%, результаты теста могут быть ошибочными). В случае неопластических заболеваний могут быть получены более высокие значения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА ПРОБ

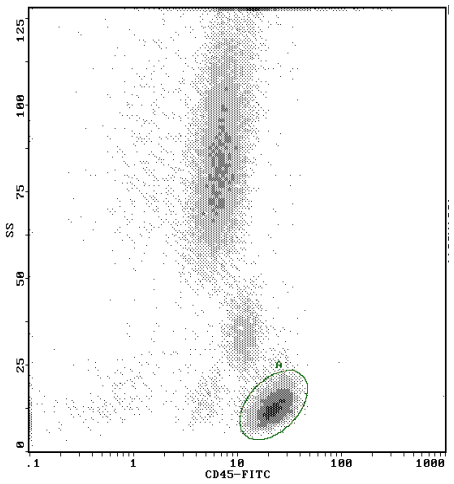
ВНИМАНИЕ: Если лазер на проточном цитометре неверно выровнен или вставлены несоответствующие фильтры или неправильно настроены селекторы, результаты могут оказаться ошибочными.

1. Составьте двухпараметрическую гистограмму CD45-FITC (FL1 LOG) к SS(боковому рассеянию) (90°наименее значимого значения). Может быть получен трёхчастный перепад. Нарисуйте селектор вокруг лимфоцитов, обладающих яркой CD45+ FITC флуоресценцией и низким боковым рассеянием (SS) (см. Рисунок 1).
2. Для изотипического контроля составьте двухпараметрическую гистограмму с использованием селектора лимфоцитов MsIgG1-RD1 (FL2 LOG) и MsIgG1-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) (см. Рисунок 2). Выставьте Quad Stats для определения 98% (номинально) неспецифического мечения, используя изотипический контроль.
3. Для анализа проб, используйте установленные на изотипическом контроле Quad Stats и составьте, используя CD4-RD1 (FL2 LOG) и CD3-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG), двухпараметрическую гистограмму с использованием селектора лимфоцитов (см. Рисунок 3).

Следующие гистограммы являются примерами нормальных проб цельной крови, окрашенных CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 и CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5, лизированных с помощью системы реагентов MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP и проанализированных на проточном цитометре COULTER EPICS XL-MCL (4 сенсора флуоресценции) с использованием селектора лимфоцитов. Quad Stats были выставлены для определения 98% (номинально) неспецифического мечения с использованием изотипического контроля.

На Рисунке 3 общий процент CD3 положительных клеток вычислен суммированием значений 2 и 4 квадрантов. Общий процент CD4 положительных клеток вычислен суммированием значений 1 и 2 квадрантов. Процент CD3+/CD4+ положительных клеток получен прямо из квадранта 2.

Рисунок 1. Двухпараметрическая гистограмма CD45-FITC (FL1 LOG) к SS для идентификации лимфоцитов (Селектор A).



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 2. Двухпараметрическая гистограмма MsIgG1-PC5 (FL4 LOG) к MsIgG1-RD1 (FL2 LOG) с использованием селектора лимфоцитов (Селектор A) для установления Quad Stats.

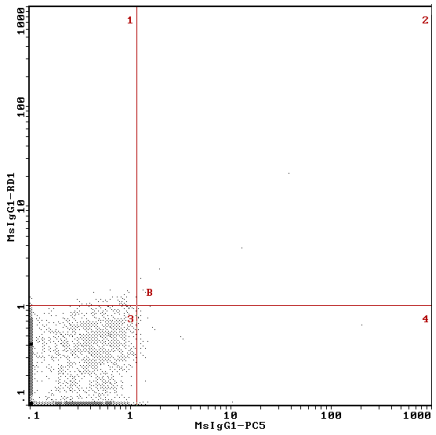
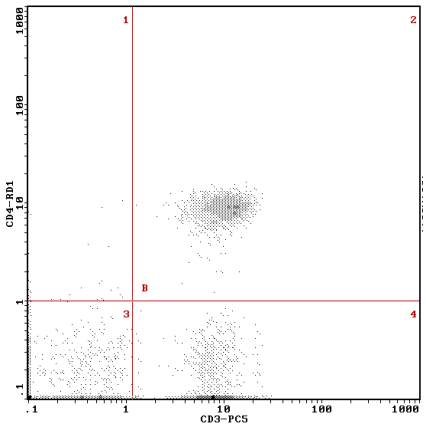


Рисунок 3. Двухпараметрическая гистограмма CD3-PC5 (FL4 LOG) к CD4-RD1 (FL2 LOG) с использованием селектора лимфоцитов (Селектор A).



АБСОЛЮТНОЕ КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК

Абсолютное количество клеток может быть установлено двумя способами. Стандартный (непрямой) метод для вычисления абсолютного количества клеток сочетает результаты гематологии и проточной цитометрии и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/мкл) = Общее число белых клеток крови (клеток/мкл) x % лимфоцитов x % положительно-окрашенных клеток ÷ 10^4

Прямой метод Flow-Count использует флуоросферы Flow-Count для прямого определения абсолютного количества и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/мкл) = (Общее число клеток-мишеней ÷ общее число подсчитанных флуоросфер Flow-Count) x аналитическая концентрация флуоросфер Flow-Count

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для достижения оптимальных результатов следует окрашивать образцы в течение 6 часов после их отбора. Отберите образцы при комнатной температуре в пробирки для забора крови перед мечением и анализированием. Не охлаждайте. Охлаждённые образцы могут дать аномальные результаты.
2. Для минимизации вероятности получения неоптимальных результатов анализировать меченые клетки следует быстро.
3. Рекомендуемая жизнеспособность клеток – ≥90%, но её может быть сложно добиться в некоторых аномальных образцах.
4. Продолжительное воздействие агентов лизиса на клетки может привести к разрушению белых клеток крови и потери клеток популяции-мишени.
5. Часть красных клеткок крови может не пройти лизис в следующих случаях: наличие ядросодержащих красных клеток крови, аномальных концентраций белков или при гемоглобинопатиях. Это может привести к ошибочно заниженным результатам из-за учёта нелизированных красных клеток крови как лейкоцитов.
6. Этот реагент создан для использования с препаратами цельной крови. Он может быть использован с лиофилизированным препаратом лимфоцитов COULTER CYTO-TROL Control Cells. Не рекомендуется использовать со свежими или замороженными препаратами мононуклеарных клеток.
7. Этот реагент не следует разбавлять, разводить на аликвоты или замораживать. Использовать в соответствии с упаковкой.
8. Этот реагент предназначен только для использования в проточной цитометрии.
9. Аномальные состояния здоровья не всегда представлены аномальными процентами отдельных популяций лейкоцитов. Анализ крови пациента в таком состоянии может давать такое же процентное содержание лейкоцитов, как и у здорового человека. Пользуйтесь результатами теста совместно с клиническими и иными диагностическими данными.
10. Особые проблемы могут возникнуть с отдельными пациентами из-за изменённых или очень низких значений отдельных клеточных популяций.
11. Оценка некоторых пациентов, пролеченных OKT3, с использованием реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/ CD4-RD1/CD3-PC5 может дать неадекватные результаты.[41-43]
12. Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, могут быть ошибочными, если лазер не верно выровнен или неправильно установлены селекторы.
13. Из-за недопустимой вариабельности, выявляемой при сравнении методик различных лабораторий для определения абсолютного количества лимфоцитов, необходимо провести оценку точности используемого метода.[44]

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Пробы цельной крови были собраны у практически здоровых мужчин и женщин. Набранная популяция происходит из разнообразных мест и включает представителей восточных и центрально-западных штатов США, без учёта расы, по возрасту попадающих в пределы 18-85 лет (n = 197: 18-85; n = 3: возраст неизвестен). Клетки были окрашены реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5. Значения, полученные с помощью проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов) представляют CD3+, CD4+ и CD3+/CD4+ клетки и даны в последующей таблице. Для каждой пробы были получены подсчёт белых клеток крови и трёхчастный перепад. Абсолютное количество клеток было определено с использованием стандартного (непрямого) метода. Значения, даны в виде % от общего числа лимфоцитов и абсолютного числа (клеток/мкл).

Эти значения предлагаются только в качестве примера. В каждой лаборатории следует установить собственные ожидаемые значения на основе проб от здоровых доноров из местного населения.

	НОРМАЛЬНАЯ ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ			
	n	Мини-мальное	Макси-мальное	Среднее ±1SD
% + Лимфоцитов				
CD3+	200	54	94	74,9 ±6,7
CD4+	200	15	72	48,7 ±9,0
CD3+/CD4+	200	14	72	47,3 ±9,0
Абсолютное количество				
CD3+	200	443	3577	1512 ±523
CD4+	200	145	2644	987 ±385
CD3+/CD4+	200	140	2639	961 ±383

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ:

CD45 экспрессируется на всех гемопоэтических клетках, за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников.[11,12] Он не был обнаружен в дифференцированных негемопоэтических тканях.[11-14]

CD4 экспрессируется на популяции Т-индукторов периферической крови.[15,16] В небольших количествах он также экспрессируется на некоторых моноцитах.[17]

CD3 в норме экспрессируется на поверхности зрелых тимоцитов и на покоящихся и активированных зрелых Т-лимфоцитах периферической крови (как в популяциях индукторов, так и супрессоров и цитотоксических клеток).[22-24]

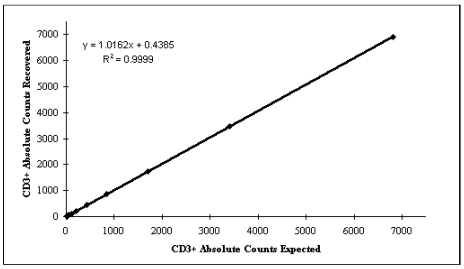
Для оценки перекрестной клеточной реактивности моноклональные антитела CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 были проверены на пробах человеческой крови здоровых взрослых доноров. Результаты единообразно показали, что CD3 и CD4 моноклональные антитела реагируют специфическим образом с соответсвующими популяциями лимфоцитов. Моноциты тускло окрашиваются CD4 моноклональным антителом, содержащимся в реагенте.

За описанием способов контроля специфического и неспецифического мечения моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/ CD4-RD1/CD3-PC5 обратитесь к ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.

ЛИНЕЙНОСТЬ

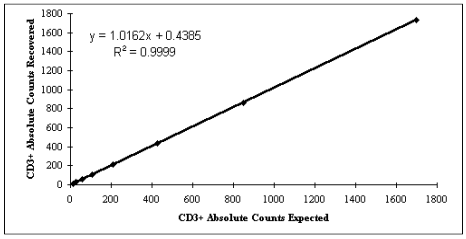
Было проведено по три повторных измерения для каждого из десяти разведений концентрированных проб COULTER CYTO-TROL Control Cells (Ч.№ 6604248 - 50 тестов) для установления диапазона концентраций CD3+ и CD4+ лимфоцитов. Клетки были помечены с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/ CD4-RD1/CD3-PC5 и проанализированы при помощи проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов). См. приведённые ниже графики.

Полный диапазон CD3+ лимфоцитов

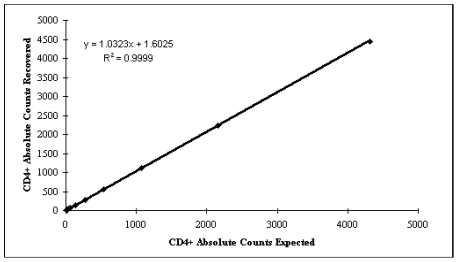


Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

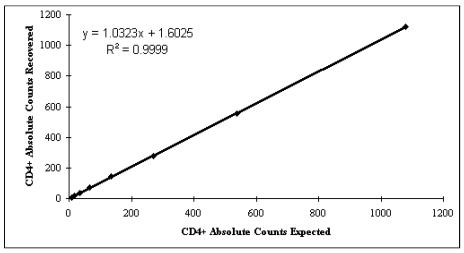
Нижняя граница диапазона CD3+ лимфоцитов, увеличение



Полный диапазон CD4+ лимфоцитов



Нижняя граница диапазона CD4+ лимфоцитов, увеличение



НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА

Степень совпадения между CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 и компаративным CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (lgG1)-FITC/ T4-RD1 была измерена на нормальных и аномальных лизированных пробах цельной крови при помощи проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов). Данные приведены в последующих таблице и рисунках, и подтверждают предположение о том, что реагенты эквивалентны по уровню реактивности зрелым Т-лимфоцитами и Т-индукторами периферической крови. Значения даны в виде процента от общего числа лимфоцитов. Значения для CD3 (lgG1)-FITC/T4-RD1 были откорректированы для чистоты селектора лимфоцитов (Пределы селектора лимфоцитов: восстановление ≥90% и чистота ≥85%).

CD3+ лимфоциты

		% CD3+ клеток		
Реагенты	**n**	**Мини-мальное**	**Макси-мальное**	**Среднее ±1SD**
CD3 (lgG1)-FITC/T4-RD1	305	6	98	76,2 ±10,0
CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5	305	6	96	75,7 ±9,7

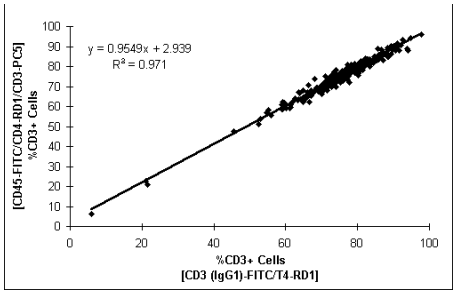
CD4+ лимфоциты

		% CD4+ клеток		
Реагенты	**n**	**Мини-мальное**	**Макси-мальное**	**Среднее ±1SD**
CD3 (lgG1)-FITC/T4-RD1	305	1	74	40,3 ±16,2
CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5	305	1	72	39,6 ±16,2

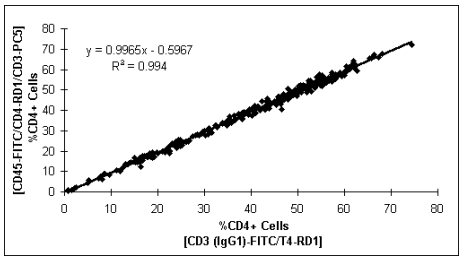
CD3+/CD4+ лимфоциты

		% CD3+/CD4+ клеток		
Реагенты	**n**	**Мини мальное**	**Макси-мальное**	**Среднее ±1 SD**
CD3 (lgG1)-FITC/T4-RD1	305	0	74	38,8 ±16,3
CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5	305	0	72	38,2 ±16,1

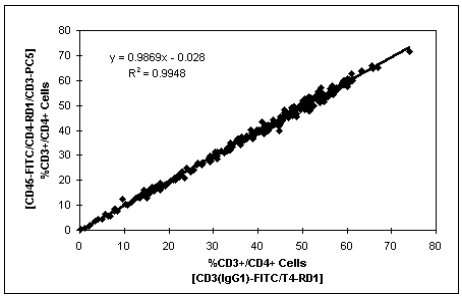
Анализ регрессии: CD3+ лимфоциты



Анализ регрессии: CD4+ лимфоциты



Анализ регрессии: CD3+/CD4+ лимфоциты



ТОЧНОСТЬ

Сходимость (внутрилабораторная)

Было проведено по десять повторных измерений для каждого из трёх уровней концентраций CD3+ и CD4+ лимфоцитов на проточном цитометре COULTER EPICS XL-MCL. Были проведены снижения числа клеток образцов нормальной цельной крови с помощью ферромагнитных частиц, связанных с моноклональными антителами для создания различных уровней значений. Клетки были помечены реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5. Значения даны в виде процента от общего числа лимфоцитов.

Концен-трация	n	Средний CD3+	%±1 SD	%CV	Средний CD4+	%±1 SD	%CV
1	10	47,9	0,46	0,97	18,6	1,07	5,78
2	10	72,0	0,85	1,18	50,0	0,69	1,39
3	10	83,4	0,66	0,79	67,4	0,67	0,99

Межлабораторная сходимость

Исследования были проведены в один день тремя различными лабораториями Coulter Corporation на трёх разных проточных цитометрах. На каждом приборе было проведено по десять повторных измерений. Во всех измерениях использовался один образец от одного здорового донора. Образец крови был разделён на три и в каждой лаборатории свой образец был окрашен реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/ CD4-RD1/CD3-PC5. Значения даны в виде процента от общего числа лимфоцитов.

Лаборатория/ Прибор	n	Средний % CD3+	±1 SD	%CV	Средний % CD4+	±1 SD	%CV
1 EPICS XL-MCL	10	69,8	0,90	1,29	52,2	0,62	1,18
2 EPICS XL-MCL	10	71,5	0,73	1,02	52,5	0,41	0,78
3 EPICS XL-MCL	10	70,9	0,29	0,40	52,8	0,42	0,90

ИЗБРАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF and Todd RF, eds. Leukocyte Typing V. 1995. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 262, 263, 268, 270.
2. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. Leukocyte Typing. 1984. Springer-Verlag, New York; pp. 28, 41-42, 44, 196.
3. McMichael AJ, ed. 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, pp. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 170-172, 176, 199, 202, 206, 302-308, 315, 475, 796-801.
4. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821-827.
5. Aiuta F, Cerottini J-C, Coombs RRA, Cooper M, Dickler HB, Froland S, Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig J, Preud'homme J-L, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegal FP, Stjernsward J, Terry WD and Wybran J. 1975. Identification, enumeration and isolation of Band T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies (IUIS), Report - July 1974. Clin Immunol and Immunopathol 3:584-597
6. Foon KA and Todd RF. 1986. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68:1-31.
7. Drexler HG, Gignac SM and Minowada J. 1988. Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Blut 57: 327-339.
8. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID. 1986. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag Vol 2: pp. 8, 15-25, 37.
9. Newman W, Targan SR and Fast LD. 1984. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. Mol Imm 21:1113-1121.
10. Fabre JW and Williams AF. 1977. Quantitative serological analysis of a rabbit anti-rat lymphocyte serum and preliminary biochemical characterisation of the major antigen recognised. Transplantation 23:349-359.
11. Coffman RL and Weissman IL. 1981. B220: A B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. Nature 289:681-683.
12. Dalchau R and Fabre JW. 1980. Identification with a monoclonal antibody of a predominantly B lymphocyte-specific determinant of the human leukocyte common antigen. J Exp Med 153:753-765.
13. Omary MB, Trowbridge IS and Battifora HA. 1980. Human homologue of murine T200 glycoprotein. J Exp Med 152:842-852.
14. Dalchau R, Kirkley J and Fabre JW. 1981. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. Eur J Immunol 10:737-744.
15. Reinherz EL, Meuer SC and Schlossman SF. 1983. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunol Today 4:5-8.
16. Reinherz EL, Morimoto C, Fitzgerald KA, Hussey RE, Daley JF and Schlossman SF. 1982. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J Immunol 128:463-468.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

17. de Martini RM and Parker JW. 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3:56-70.
18. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR and Schlossman SF. 1985. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. J Immunol 134:1508-1515.
19. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Brown HM and Schlossman SF. 1986. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. Eur J Immunol 16:198-204.
20. Meuer SC, Schlossman SF and Reinherz EL. 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility regions. Proc Natl Acad Sci USA 79:4395-4399.
21. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Somoza C, Williams AF eds. 1993. The Leukocyte Antigen Facts Book. Academic Press: London, pp.106-109.
22. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821-827.
23. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell 30:735-743.
24. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL. 1983. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature 303:808-810.
25. Benjamini E and Leskowitz S. Immunology: A Short Course. Second Edition. 1991. New York: Wiley-Liss, pp. 211-244.
26. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF. 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol 125:1269-1274.
27. Felsenstein D, Carney WP, Iacoviello VR and Hirsch MS. 1985. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152:198-203.
28. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL. 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun 40:472-477.
29. Goldstein G, Lifter J and Mittler R. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Fabre JW, eds. 1982. New York, NY: Academic Press, pp. 39-70.
30. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM. 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood 74:2203-2211.
31. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, Van Leeuwen E, Capel PJA and Haanen C. 1989. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WTI-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood 74:1152-1158.
32. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB. 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47:465-471.
33. Fauci AS. 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239:617-622.
34. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV. 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2:114-124.
35. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, and Berstein ID. eds. 1986. Leukocyte Typing II, Volume I. New York, NY: Springer-Verlag, p. 8.
36. Reinherz EL, Kung, PC, Goldstein G and Schlossman SF.1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J Immunol 123:1312-1317.
37. Beverley PCL and Callard RE. 1981. Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cells antibody. Eur J Immunol 11:329-334.
38. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard. 1991. NCCLS Document H3-A3.
39. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA. 1990. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 11:453-459.
40. Nicholson JKA, Hubbard M and Jones BM. 1996. Use of CD45 fluorescence and side scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 26:16-21.
41. Gebel HM, Lebeck LL, Jensik SC, Landay AL and Bray RA. 1989. Discordant expression of CD3 and T-cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated with OKT3. Transplantation Proceedings 1:1745-1746.
42. Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissensen GW, Karjalainen K and De Le Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In Leukocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H and Kr. von dem Borne AEG, eds. 1989. Oxford: Oxford University Press, pp. 295-296.
43. Schroeder TI and Chatenoud L: Immunological monitoring during treatment with OKT3. Presented under the auspices of the American Society of Transplant Surgeons.
44. Koepke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5
REF 6607015 - 50 тестов (0,5 mL)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с локальным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

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

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Версия HD, 06/2016

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- Обновленный адрес представительства в ЕС
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/ CD3-PC5

REF 6607017 - 50 тестов

Ч.№ 4238015-KD

	CD45-FITC	CD8-RD1	CD3-PC5
Специфичность	CD45	CD8	CD3
Клон	B3821F4A[1]	SFCI21Thy2D3[2,36,37]	UCHT1[2,38]
Гибридома	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c
Иммуноген	Агент трансфекции, содержащий кДНК CD45 человека	Тимоциты человека	Тимоциты человека и лимфоциты периферической крови от человека с лейкемией Сезари
Подкласс иммуноглобулина	IgG2b[1]	IgG1[2,37]	IgG1[2,37]
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость	Специальная среда	Специальная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждается при 468-509 nm / Излучает на 504-541 nm	Возбуждается при 486-580 nm / Излучает на 568-590 nm	Возбуждается при 486-580 nm / Излучает на 660-680 nm
Конъюгат	FITC (Изотиоцианат флуоросцеина)	RD1 (Фикоэритрин)	PC5 (Фикоэритрин-Cy5)
Молярная концентрация	FITC/Белок: 3-10	RD1/Белок: 0,5-1,5	PC5/Белок: 0,5-1,5
Определение светорассеивания	Переднее и (или) боковое	Переднее и (или) боковое	Переднее и (или) боковое

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

РЕАГЕНТ ДЛЯ ПОДСЧЁТА КЛЕТОК ДЛЯ ПРОТОЧНЫХ ЦИТОМЕТРОВ COULTER EPICS

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5 является трёхцветным реагентом, содержащим три мышиных моноклональных антитела. Все три антитела помечены флуорохромами разных цветов. Этот реагент позволяет одновременно провести идентификацию и подсчёт CD3+, CD8+ и CD3+/CD8+ лимфоцитов при проточной цитометрии цельной крови.[1-3] CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/ MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 в качестве изотипического контроля используется для отслеживания неспецифического связывания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов периферической крови состоит из клеток трёх типов: Т (происходящие из тимуса), В (происходящие из костного мозга) и нулевые клетки.[4] Эти типы клеток при микроскопии морфологически неотличимы, но могут быть идентифицированы по специфическим антигенным отличиям клеточных мембран.

Т и В лимфоциты играют главную роль в работе иммунной системы. Различные подтипы Т-лимфоцитов могут распознавать специфические антигены, функционировать как клетки-эффекторы и/или контролировать как тип, так и интенсивность клеточного и/или гуморального иммунного ответа. После активации антигеном или макрофагом посредством Т-лимфоцита, отдельные В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые синтезируют и выделяют специфические иммуноглобулины (Ig).

В прошлом Т и В лимфоциты идентифицировались и подсчитывались с использованием таких клеточных маркеров, как рецептор к эритроцитам барана на Т-лимфоцитах (Е-розеток) и поверхностный мембранный иммуноглобулин (Sm) Ig на В-лимфоцитах.[5,6] Хотя методика Е-розеток специфична для Т-лимфоцитов, её применение ограничивает то, что визуальная идентификация и самостоятельный подсчёт комплексов Т-лимфоцитов с овечьими эритроцитами возможны только через оптический микроскоп. Измерение SmIg для идентификации и посчёта В-лимфоцитов также ограничено тем, что другие клеточные популяции могут экспрессировать SmIg и/или связывать иммуноглобулин за счёт рецепторов к Fc-фрагменту IgG, что приведёт к ложнопозитивному результату.

Позднее были созданы моноклональные антитела для идентификации и подсчёта Т и В лимфоцитов.[6,7] В отличие от относительно неспецифичных поликлональных антител (гетероантисыворотки) к этим клеточным популяциям, моноклональные антитела связывают отдельные специфические поверхностные антигены Т и В клеток. Это позволяет не только более точно и аккуратно подсчитать лимфоциты, но и, используя другие клеточные маркеры (TdT, антиген, относящийся к HLA-D, SmIg), идентифицировать различные стадии дифференцировки Т и В клеток.

Различные поверхностные антигены экспрессируются и исчезают на Т и В лимфоцитах в зависимости от стадии их созревания (дифференцировки) и/или функционального состояния клеток. Начав экспрессировать антиген, клетка может коэкспрессировать один или несколько из этих антигенов в течение различных периодов времени.

Экспрессия Т-лимфоцитами общих для Т-клеток поверхностных антигенов происходит в следующем порядке: CD7 (ранние протимоциты); CD2 (промежуточные протимоциты); CD5 (незрелые тимоциты), цитоплазматический CD3 (незрелые и обыкновенные тимоциты) и CD3 (зрелые тимоциты).[3,7] Затем начинается коэкспрессия (обыкновенными тимоцитами) и чистая экспрессия (зрелыми тимоцитами) CD4 (индукторы) и CD8 (супрессоры/ цитотоксические клетки).[3,7] CD7, CD2, CD5 и CD3 продолжают коэкспрессироваться с CD4 или CD8 в течение всего процесса дифференцировки Т-лимфоцитов, в том числе и на покоящихся и активированных зрелых Т-лифоцитах периферической крови или лимфоидной ткани.

Экспрессия В-лимфоцитами общих для В-клеток поверхностных антигенов происходит в следующем порядке: CD19 (коммитированные предшественники В-клеток/про-В клетки); CD20 (ранние пре-В клетки).[3,7,8] CD19 и CD20 продолжают коэкспрессироваться в течение всего процесса дифференциации В-лимфоцитов, в том числе и на покоящихся и активированных зрелых В-лифоцитах периферической крови или лимфоидной ткани. Оба антигена пропадают на последней стадии дифференцировки В-лимфоцитов, стадии плазматической клетки.

CD21 (покоящиеся зрелые В-лимфоциты периферической крови или лимфоидной ткани) и CD22 (пре-В клетки) являются поверхностными антигенами В-клеток, пропадающими при активации у зрелых В-лимфоцитов периферической крови или лимфоидной ткани[3,8] Поверхностной экспрессия CD22 предшествует цитоплазматическая (про-В клетки).

Реагенты со специфическими моноклональными антителами, связывающими поверхностные антигены, общие для Т или В клеток, могут быть использованы для идентификации или подсчёта зрелых Т или В лимфоцитов, соответственно. Реагенты со специфическими моноклональными антителами к определённым поверхностным антигенам также могут быть использованы для определения стадии созревания (дифференцировки) и/или функционального состояния клеток. Данный тест использует моноклональные антитела CD3, CD8, и CD45 для идентификации или подсчёта зрелых Т-лимфоцитов и Т-супрессоров/цитотоксических Т-лимфоцитов за счёт специфического связывания поверхностных антител, общих для Т-лимфоцитов и Т-супрессоров/цитотоксических Т-лимфоцитов, CD3 и CD8, соответственно. Кроме того, тест позволяет одновременно исследовать различные популяции лимфоцитов в одной пробе цельной крови, используя только один реагент.

CD45

Антитело CD45 распознаёт представителей семьи общих лейкоцитарных антигенов CD45 с молекулярной массой в 180, 190, 210 и 220 kd.[3,9,10] Он известен также как общий лейкоцитарный антиген (LCA). CD45 экспрессируется на всех гемопоэтических клетках, за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников.[11,12] Он не был обнаружен в дифференцированных негемопоэтических тканях.[11-14]

CD8

Антиген CD8 обладает молекулярной массой в 68 kd.[15,16] В норме он экспрессируется на около 80% тимоцитов, примерно 30-35% Т-лимфоцитов периферической крови и некоторых NK-клетках.[15,17,18] CD8+ лимфоциты играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа за счёт своей супрессорной и цитотоксической активности.[19-21] CD8 связывается с антигеном главного комплекса гистосовместимости I класса (MHCI) на клетках-мишенях.[15,21]

CD3

Антитело к CD3 антигену спефически связывается с эпсилон-цепью CD3 компонента комплекса Т-клеточного рецептора (TCR).[3,22] Молекулярная масса этой цепи составляет 20 kd.[22] Это специфический для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

клеточной линии общий для Т-клеток антиген, в норме экспрессирующийся на поверхности зрелых тимоцитов и на покоящихся и активированных зрелых Т-лимфоцитах периферической крови (как в популяциях индукторов, так и супрессоров и цитотоксических клеток).[23-25]

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

CD3+ и/или CD8+ лимфоциты

Процент CD3+ и/или CD8+ лимфоцитов и их абсолютное количество могут быть использованы при оценке иммунного статуса, связанного с известными или неизвестными заболеваниями и для контроля уровня лимфоцитов после трансплантации органов.[26-33]

К примеру, идентификация аномальных уровней CD3+ и/или CD8+ лимфоцитов может помочь при диагностировании и/или прогнозировании различных аутоиммунных заболеваний, связанных с изменением количества белых клеток крови. Изменение процента CD3+ и/или CD8+ лимфоцитов, замеченное после трансплантации органа (к примеру, почки), указывает на то, что измерение чисел CD3+ и/или CD8+ лимфоцитов может оказаться полезным для отслеживания изменений этих клеточных популяций.

Соотношение Т4/Т8

Изменения уровней CD4+ и/или CD8+ лимфоцитов, связанное с заболеваниями, может изменить Т4/Т8 соотношение числа индукторов: супрессоров/ цитотоксических клеток. Поэтому соотношение Т4/Т8 может оказаться полезным при диагностировании и/или прогнозировании в качестве индикатора индикатора иммунного статуса организма.

Соотношение Т4/Т8 вместе с числом CD4+ лимфоцитов широко использовались в качестве лабораторных параметров для оценки комплекса, связанного со СПИДом и собственно СПИДом.[34, 35] У пациентов на продвинутой стадии СПИДа соотношение Т4/Т8 стремится к нулю, а наличие CD4+ лимфоцитов не регистрируется.[34] При этом уровень CD8+ лимфоцитов может быть нормальным, повышенным или пониженным.

У пациентов со стабильной функцией почечного аллотрансплантата после трансплантации наблюдается пониженный процент CD4+ и повышенный процент CD8+ лимфоцитов без значимых изменения соотношений Т4/Т8.[6] Кроме того, низкие соотношения Т4/Т8 и пониженный процент CD4+ лимфоцитов наблюдался у пациентов во время фенотипического восстановления после аутологичной трансплантации очищенного костного мозга.[31,32]

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Этот тест основан на способности моноклонального антитела связываться с поверхностью клеток, экспрессирующих определённые антигенные детерминанты. CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/ CD8-RD1/CD3-PC5 является комбинацией трёх мышиных моноклональных антител, специфичных к разным поверхностным антигенам. Специфическая окраска клеток достигается за счёт инкубации цельной крови с трёхцветным реагентом CYTO-STAT triCHROME. Вторая идентичная проба крови метится изотипическим контролем CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 для оценки неспецифической фоновой флуоресценции. Красные клетки крови подвергаются лизису, а оставшиеся белые клетки крови анализируются с помощью проточной цитометрии с использованием селекторов лимфоцитов. На первой гистограмме селектор лимфоцитов определяется как содержащий яркую CD45+ FITC флуоресценцию и низкое боковое рассеяние (SS). На второй гистограмме процент положительно-окрашенных клеток определяется для четырёх квадрантов: CD3-/CD8+ (только положительная RD1 флуоресценция), CD3+/CD8+ (положительная PC5/RD1 флуоресценция), CD3-/CD8- (отрицательная PC5/RD1 флуоресценция) и CD3+/CD8- (только положительная PC5 флуоресценция).

РЕАГЕНТ

Смотрите таблицу странице 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Концентрация антител — 2,0/0,5/0,5 µg/тест.

Кроме антител, в состав реагентов входят 0,2% БСА, 0,01 М фосфата калия, 0,15 М NaCl, 0,1% NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com***.

1. Этот реагент содержит 0,1% азида натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. Во время утилизации соединения азида следует смывать проточной водой. Рекомендуется соблюдение этих предосторожностей для избежания образования отложений в металлических трубах, что может создавать взрывоопасные условия. При попадании в глаза или на кожу, тщательно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми материалами, с ними соприкасающимися, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
3. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта проб с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не используйте антитело после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.
5. Минимизируйте воздействие света на реагент при хранении или инкубации.
6. Избегайте бактериального загрязнения реагентов, так как оно может привести к ошибочным результатам.
7. Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этим реагентом.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Открытый реагент сохраняет стабильность в течение 90 дней после вскрытия при хранении при температуре 2-8°C. Сразу после использования верните реагент к 2-8°C. Не замораживайте. Минимизируйте воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любое внешнее изменение реагента (в норме это прозрачная розовая жидкость) или значительные колебания значений контрольных показателей могут указывать на разрушение реагента, и в таком случае его не следует использовать.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Моноклональное антитело CYTO-STAT triCHROME используется прямо из флакона.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

ВНИМАНИЕ: Стабильность проб крови очень изменчива. Для оптимальных результатов начинайте анализ в течение 6 часов после венепункции. Непомеченная, предохраняемая от свёртывания кровь до начала процедуры должна храниться при температуре 20-25°C. Не охлаждайте.
Заберите венепункцией в асептических условиях пробу венозной крови в пробирку для забора крови, используя соответствующий антикоагулянт (рекомендуется ЭДТА). [39] Для каждого теста требуется 100 µL цельной крови. Соберите достаточно крови (от 1 до 2 mL на пробирку) для проведения тестов и постановки контроля, и храните аутологичную плазму на случай необходимости разведения пробы.
Подсчёт белых кровяных клеток и проверка жизнеспособности клеток должны быть проведены, следуя установленной лабораторной процедуре, для каждого образца венозной крови. Рекомендуемая жизнеспособность клеток – ≥90%, но её может быть сложно добиться в некоторых аномальных образцах.

ПРОЦЕДУРА ИММУННОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT triCHROME

ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5
REF 6607017 - 50 тестов (0,5 mL)

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Агент лизиса эритроцитов (при необходимости).

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

Разбавитель (при необходимости) аутологичная плазма

ИЛИ

Система реагентов COULTER IMMUNOPREP для рабочих станций COULTER MULTI-Q-PREP или TQ-Prep, Ч.№ 7546999 – 300 тестов

Разбавитель (при необходимости) аутологичная плазма

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/ MsIgG1-PC5, Ч.№ 6607019 – 50 тестов (0,5 mL)

Комплект реагентов CYTO-COMP, Ч.№ 6607021

Комплект клеток CYTO-COMP, Ч.№ 6607023

COULTER CYTO-TROL Control Cells,
Ч.№ 6604248 - 50 тестов

Флуоросферы Flow-Count, Ч.№ 7547053 (дополнительный реагент)

тест-пробирки 12 x 75 mm

Пробирки для забора цельной крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Пипетки для переноса

Пастеровские пипетки

Микропипетки

Вихревой смеситель

Проточный цитометр (Обратитесь к главе Требуемое оборудование)

Счётчик клеток или гемацитометр

Фильтр (для COULTER EPICS XL/XL-MCL только с 3 сенсорами флуоресценции), Ч.№ 6915056

ТРЕБУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

и флуоресцентной компенсации до проведения анализа.

ПРОЦЕДУРА

1. Оптимальное мечение достигается при количестве белых клеток крови в пределах 3-10 x 10^3 клеток/µL. При числах белых клеток крови, превышающих 10 x 10^3 клеток/мкл необходимо разбавление, а при числах белых клеток крови ниже 3 x 10^3 клеток/µL необходимы центрифугирование и ресуспензирование для получения чисел в пределах 3-10 x 10^3 клеток/µL. При использовании систем реагентов COULTER Q-PREP/IMMUNOPREP или COULTER MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP в качестве разбавителя рекомендуется использовать аутологичную плазму.

Аномальные пробы

a. Большое число белых клеток крови (>10 x 10^3 клеток/µL)
   10-20 x 10^3: Разбавьте кровь 1:2.
   20-30 x 10^3: Разбавьте кровь 1:3.
   30-40 x 10^3: Разбавьте кровь 1:5.
   40-60 x 10^3: Разбавьте кровь 1:6.
   60-100 x 10^3: Разбавьте кровь 1:10.
   100-200 x 10^3: Разбавьте кровь 1:20.

b. Малое количество белых клеток крови (<3 x 10^3 клеток/µL) – Используйте метод лейкоцитных плёнок
   1) Центрифугируйте кровь при 20-25°C на 500 x g в течение 5 минут.
   2) Отберите лейкоцитную плёнку пастеровской пипеткой, забрав частично красные клетки крови и немного плазмы, чтобы быть уверенным, что все белые клетки крови извлечены.
   3) Полностью ресуспензируйте клетки, несколько раз перемешав пастеровской пипеткой.
   4) Определите концентрацию клеток, используя счётчик клеток или гематицометр.
   5) Доведите разбавителем концентрацию клеток до 10 x 10^3 клеток/µL.

2. Для каждой пробы промаркируйте тест-пробирки 12 x 75 mm, одну под моноклональные антитела и другую под изотипический контроль. Добавьте в соответственно маркированную тест-пробирку 10 µL of CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5 или CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5.
3. Добавьте в каждую тест-пробирку по 100 µL пробы венозной крови. Следует избегать загрязнения краев или стенок тест-пробирок кровью, потому что это может привести к неполному лизису.
4. Аккуратно смешайте, пользуясь вихревым смесителем. Инкубируйте реакционные смеси при 20-25°C в течение 10-12 минут.

ВАЖНО: Если капли реагента остаются у края тест-пробирки, их следует удалить, иначе нелизированные красные кровяные клетки могут загрязнить образец и исказить результаты. Для их удаления можно использовать ватную палочку.

5. Лизируйте красные кровяные клетки в каждой из тест-пробирок, следуя рекуомендуемой для выбранного метода лизиса процедуре (система реагентов COULTER Q-PREP/IMMUNOPREP, система реагентов COULTER MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP или система реагентов COULTER TQ-Prep/IMMUNOPREP).
6. Анализируйте клетки на проточном цитометре, приспособленном для анализа многоцветной флуоресценции, правильно выровненном и использующем селектор лимфоцитов в соответствии с приведённой ниже ПРОЦЕДУРОЙ АНАЛИЗА ПРОБ. Для минимизации вероятности получения неоптимальных результатов анализировать меченые клетки следует быстро.
   a. Результаты флуоресцентной проточной цитометрии должны быть нанесены на логарифмическую шкалу.
   b. Значения бокового рассеяния должны быть нанесены на линейную шкалу.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ДЛЯ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизирован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции в соответствии с рекомендациями производителя (за ними обратитесь к руководствам по приборам).

Флуорохромы изотиоцианат флуоросцеина (FITC), фикоэритрин (RD1) и фикоэритрин-Cy5 (PC5) излучают на разных длинах волн, но всё же частично их спектральные диапазоны перекрывают друг друга, что следует откорректировать с помощью электронной компенсации. Оптимальные уровни компенсации можно установить проанализировав на двухпараметрической диаграмме донорские клетки, по отдельности помеченные каждым флуорохромом. В качестве альтернативы можно окрасить клетки CYTO-COMP соответствующими комбинациями флуорохромов из комплекта реагентов the CYTO-COMP. В обоих случаях проводится регулировка для того, чтобы гарантировать отсутствие мечения в двухцветном квадранте (квадрант 2) для каждого из флуорохромов. Помеченные CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5 COULTER CYTO-TROL Control Cells могут быть использованы для проверки установок компенсации.

Перед тем, как проводить анализ проб, следует пометить контрольные пробы (например, COULTER CYTO-TROL Control Cells) для проверки реактивности антител.

Специфическое и/или неспецифическое связывание Fc-фрагмента антител с моноцитами и гранулоцитами пробы можно исключить с помощью правильного селектора лимфоцитов на проточном цитометре.[40] Лимфоциты определяются как обладающие яркой CD45+ флуоресценцией и низким боковым рассеянием.[41]

Изотипический контроль CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 используется для определения положения курсора для учёта неспецифического связывания Fc–фрагмента с лимфоцитами пробы. Курсоры располагаются так, чтобы включить 98% (номинально) неспецифической флуоресценции в 3 квадрант. Неспецифическая флуоресценция в квадрантах 1, 2 и 4 для любой контрольной пробы обычно ограничивается 1-2% или менее процентами у здоровых представителей (если это значение оказывается выше 1-2%, результаты теста могут быть ошибочными). В случае с неопластическими заболеваниями могут быть получены более высокие значения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА ПРОБ

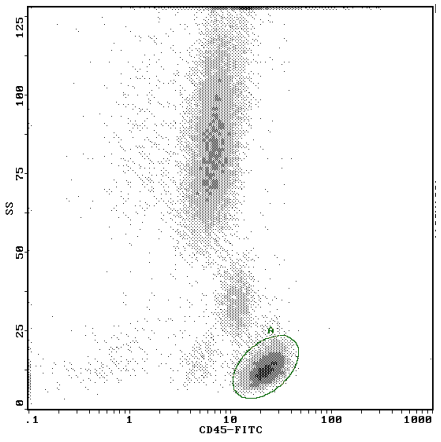
ВНИМАНИЕ: Если лазер на проточном цитометре не верно выровнен или вставлены несоответствующие фильтры или неправильно установлены селекторы, результаты могут оказаться ошибочными.

1. Составьте двухпараметрическую гистограмму CD45-FITC (FL1 LOG) к SS (90°наименее значимого значения). Может быть получен трёхчастный перепад. Нарисуйте границу вокруг лимфоцитов, обладающих яркой CD45+ FITC флуоресценцией и низким боковым рассеянием (SS) (см. Рисунок 1).
2. Для изотипического контроля составьте двухпараметрическую гистограмму с использованием селектора лимфоцитов MsIgG1-RD1 (FL2 LOG) и MsIgG1-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) (см. Рисунок 2). Выставьте Quad Stats для определения 98% (номинально) неспецифического мечения, используя изотипический контроль.
3. Для анализа проб, используйте установленные на изотипическом контроле Quad Stats и составьте двухпараметрическую гистограмму с использованием селектора лимфоцитов CD8-RD1 (FL2 LOG) и CD3-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) (см. Рисунок 3).

Следующие гистограммы являются примерами нормальных проб цельной крови, помеченых CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 и CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5, лизированных с помощью системы реагентов MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP и проанализированных на проточном цитометре COULTER EPICS XL-MCL (4 сенсора флуоресценции) с использованием селектора лимфоцитов. Quad Stats были выставлены для определения 98% (номинально) неспецифического мечения с использованием изотипического контроля.

На Рисунке 3 общий процент CD3 положительных клеток вычислен суммированием значений 2 и 4 квадрантов. Общий процент CD8 положительных клеток вычислен суммированием значений 1 и 2 квадрантов. Процент CD3+/CD8+ положительных клеток получен прямо из квадранта 2.

Рисунок 1. Двухпараметрическая гистограмма CD45-FITC (FL1 LOG) к SS для идентификации лимфоцитов (Селектор A).



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 2. Двухпараметрическая гистограмма MsIgG1-PC5 (FL4 LOG) к MsIgG1-RD1 (FL2 LOG) с использованием селектора лимфоцитов (Селектор A) для установления Quad Stats.

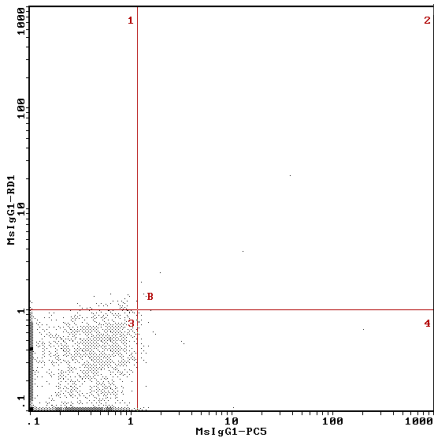
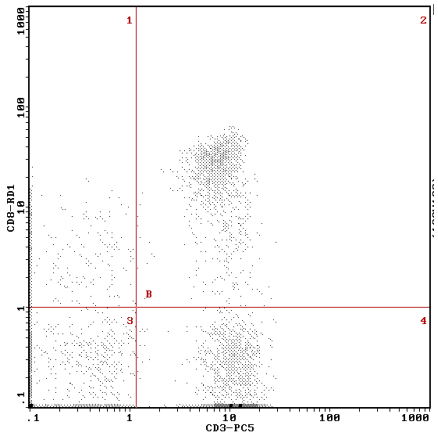


Рисунок 3. Двухпараметрическая гистограмма CD3-PC5 (FL4 LOG) к CD8-RD1 (FL2 LOG) с использованием селектора лимфоцитов (Селектор A).



АБСОЛЮТНОЕ КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК

Абсолютное количество клеток может быть установлено двумя способами. Стандартный (непрямой) метод для вычисления абсолютного количества клеток сочетает результаты гематологии и проточной цитометрии и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/мкл) = Общее число белых клеток крови (клеток/мкл) x % лимфоцитов x % положительно-окрашенных клеток ÷ 10^4

Прямой метод Flow-Count использует флуоросферы Flow-Count для прямого определения абсолютного количества и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/мкл) = (Общее число клеток-мишеней ÷ общее число подсчитанных флуоросфер Flow-Count) x аналитическая концентрация флуоросфер Flow-Count

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для достижения оптимальных результатов следует помечать образцы в течение 6 часов после их отбора. Отберите образцы при комнатной температуре в пробирки для забора крови перед мечением и анализом. Не охлаждайте. Охлаждённые образцы могут дать аномальные результаты.
2. Для минимизации вероятности получения неоптимальных результатов анализировать меченые клетки следует быстро.
3. Рекомендуемая жизнеспособность клеток – ≥90%, но её может быть сложно добиться в некоторых аномальных образцах.
4. Продолжительное воздействие агентов лизиса на клетки может привести к разрушению белых клеток крови и потери клеток популяции-мишени.
5. Часть красных клеткок крови может не пройти лизис в следующих случаях: наличие ядросодержащих красных клеток крови, аномальных концентраций белков или при гемоглобинопатиях. Это может привести к ошибочно пониженным результатам из-за учёта нелизированных красных клеток крови как лейкоцитов.
6. Этот реагент создан для использования с препаратами цельной крови. Он может быть использован с лиофилизированным препаратом лимфоцитов COULTER CYTO-TROL Control Cells. Не рекомендуется использовать со свежими или замороженными препаратами мононуклеарных клеток.
7. Этот реагент не следует разбавлять, разводить на аликвоты или замораживать. Использовать в соответствии с упаковкой.
8. Этот реагент предназначен только для использования в проточной цитометрии.
9. Аномальные состояния здоровья не всегда представлены аномальными процентами отдельных популяций лейкоцитов. Анализ крови пациента в таком состоянии может давать такие же проценты лейкоцитов, как и у здорового человека. Пользуйтесь результатами теста совместно с клиническими и иными диагностическими данными.
10. Особые проблемы могут возникнуть с отдельными пациентами из-за изменённых или очень низких значений отдельных клеточных популяций.
11. Некоторых пациентов, пролеченных OKT3, нельзя оценивать с использованием реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5. [42-44]
12. Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии могут быть ошибочными если лазер на не верно выровнен или неправильно установлены селекторы.
13. Из-за недопустимой вариабельности, выявляемой при сравнении методик различных лабораторий для определения абсолютного количества лимфоцитов, необходимо провести оценку точности используемого метода.[45]

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Пробы крови были собраны у практически здоровых мужчин и женщин. Набранная популяция происходит из разнообразных мест и включает представителей населения восточных и центрально-западных штатов США, без учёта расы и по возрасту попадающих в пределы 18-85 лет (n = 197: 18-85; n = 3: возраст неизвестен). Пробы были помечены моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5.

Значения, полученные с помощью проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов) представляют CD3+, CD8+ и CD3+/CD8+ клетки и даны в последующей таблице. Для каждой пробы были получены подсчёт белых клеток крови и трёхчастный перепад. Абсолютное количество клеток было определено с использованием стандартного (непрямого) метода. Значения, даны в виде % от общего числа лимфоцитов и абсолютного числа (клеток/µL).

Эти значения предлагаются только в качестве примера. В каждой лаборатории следует установить собственные ожидаемые значения на основе проб от здоровых доноров из местного населения.

НОРМАЛЬНАЯ ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ

	n	Мини-мальное	Макси-мальное	Среднее ±1SD
% + Лимфоцитов				
CD3+	200	53	95	75,1 ±6,6
CD8+	200	12	62	29,5 ±9,2
CD3+/CD8+	200	9	60	25,6 ±9,0
Абсолютное количество				
CD3+	200	451	3572	1515 ±527
CD8+	200	209	1830	585 ±254
CD3+/CD8+	200	138	1820	510 ±243

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ:

CD45 экспрессируется на всех гемопоэтических клетках, за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников.[11,12] Он не был обнаружен в дифференцированных негемопоэтических тканях.[11-14]

CD8 в норме экспрессируется на около 80% тимоцитов и примерно 30-35% Т-лимфоцитов периферической крови и некоторых NK-клетках.[15,17,18]

CD3 в норме экспрессируется на поверхности зрелых тимоцитов и на покоящихся и активированных зрелых Т-лимфоцитах периферической крови (как в популяциях индукторов, так и супрессоров и цитотоксических клеток).[23-25]

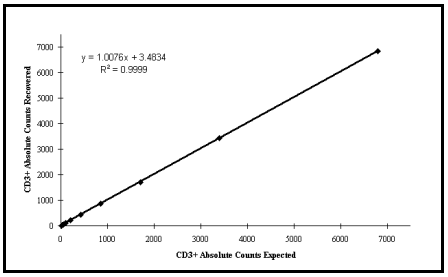
Для оценки перекрестной клеточной реактивности моноклональные антитела CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5 были проверены на пробах человеческой крови здоровых взрослых доноров. Результаты единообразно показали, что CD3 и CD8 моноклональные антитела реагируют специфическим образом с соответсвующими популяциями лимфоцитов.

За описанием способов контроля специфического и неспецифического мечения моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5 обратитесь к ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.

ЛИНЕЙНОСТЬ

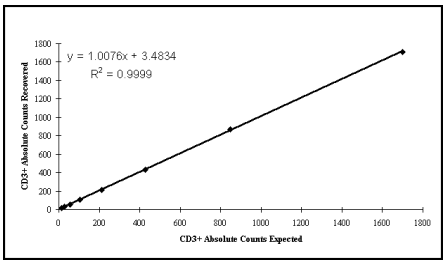
Было проведено по три повторных измерения для каждого из 10 разведений концентрированных проб COULTER CYTO-TROL Control Cells для установления диапазона концентраций CD3+ и CD8+ лимфоцитов. Клетки были помечены реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5 и проанализированы при помощи проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов). См. приведённые ниже графики.

Полный диапазон CD3+ лимфоцитов

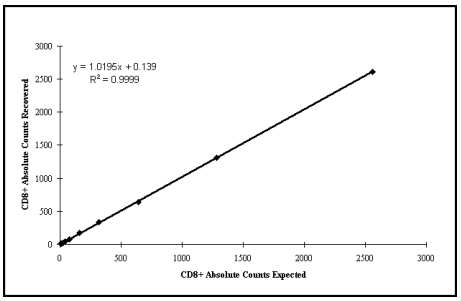


Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

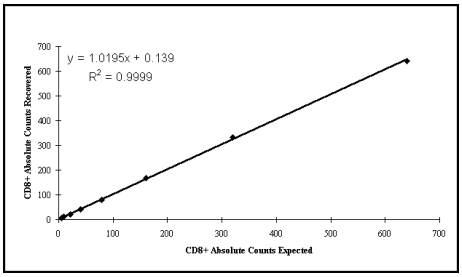
Нижняя граница диапазона CD3+ лимфоцитов, увеличение



Полный диапазон CD8+ лимфоцитов



Нижняя граница диапазона CD8+ лимфоцитов, увеличение



НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА

Степень совпадения между CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5 и компаративным CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (lgG1)-FITC/ T8-RD1 была измерена на нормальных и аномальных лизированных пробах цельной крови при помощи проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов). Данные приведены в последующих таблице и рисунках, и подтверждают предположение о том, что эти реагенты эквивалентны по уровню реактивности со зрелыми Т-лимфоцитами, Т-супрессорами и цитотоксическими Т-лимфоцитами периферической крови. Значения даны в виде процента от общего числа лимфоцитов. Значения для CD3 (lgG1)-FITC/T8-RD1 были откорректированы для чистоты селектора лимфоцитов (Пределы селектора лимфоцитов: восстановление ≥90% и чистота ≥85%).

CD3+ лимфоциты

		% CD3+ клеток		
Реагенты	**n**	**Минимальное**	**Максимальное**	**Среднее ±1SD**
CD3 (lgG1)-FITC/ T8-RD1	305	6	98	76,2 ±10,0
CD45-FITC/CD8-RD1/ CD3-PC5	305	7	96	75,8 ±9,7

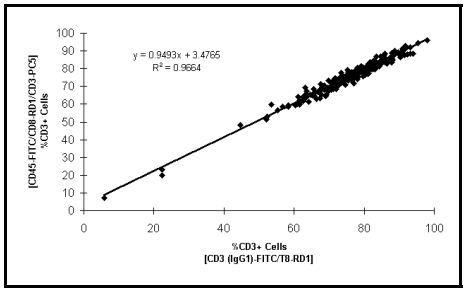
CD8+ лимфоциты

		% CD8+ клеток		
Реагенты	**n**	**Минимальное**	**Максимальное**	**Среднее ±1SD**
CD3 (lgG1)-FITC/ T8-RD1	305	2	83	38,3 ±17,1
CD45-FITC/CD8-RD1/ CD3-PC5	305	2	82	38,5 ±16,7

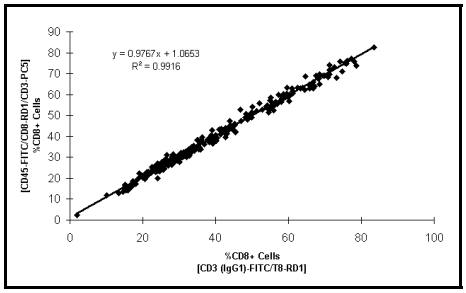
CD3+/CD8+ лимфоциты

		% CD3+/CD8+ клеток		
Реагенты	**n**	**Минимальное**	**Максимальное**	**Среднее ±1SD**
CD3 (lgG1)-FITC/ T8-RD1	305	1	83	35,0 ±17,8
CD45-FITC/CD8-RD1/ CD3-PC5	305	1	82	35,0 ±17,5

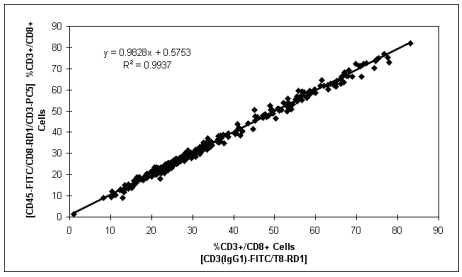
Анализ регрессии: CD3+ лимфоциты



Анализ регрессии: CD8+ лимфоциты



Анализ регрессии: CD3+/CD8+ лимфоциты



СХОДИМОСТЬ

Сходимость (внутрилабораторная)

Было проведено по десять повторных измерений для каждого из трёх уровней концентраций CD3+ и CD8+ лимфоцитов на проточном цитометре COULTER EPICS XL-MCL. Были проведены снижения числа клеток образцов нормальной цельной крови с помощью ферромагнитных частиц, связанных с моноклональными антителами для создания различных уровней значений. Клетки были помечены реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/ CD3-PC5. Значения даны в виде процента от общего числа лимфоцитов.

		Средний %			Средний %		
Концентрация	**n**	**CD3+**	**±1 SD**	**%CV**	**CD8+**	**±1 SD**	**%CV**
1	10	48,4	1,14	2,36	3,8	0,27	6,97
2	10	72,7	0,53	0,73	27,2	0,77	2,84
3	10	83,3	0,76	0,91	53,5	0,81	1,52

Межлабораторная

Исследования были проведены в один день тремя различными лабораториями Coulter Corporation на трёх разных проточных цитометрах. На каждом приборе было проведено по десять повторных измерений. Во всех измерениях использовался один образец от одного здорового донора. Образец крови был разделён на три и в каждой лаборатории свой образец был помечен реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/ CD8-RD1/CD3-PC5. Значения даны в виде процента от общего числа лимфоцитов.

		Средний			Средний		
Лаборатория/ Прибор	**n**	**% CD3+**	**±1 SD**	**%CV**	**% CD8+**	**±1 SD**	**%CV**
1 EPICS XL-MCL	10	70,3	0,53	0,75	18,3	0,53	2,90
2 EPICS XL-MCL	10	71,5	0,60	0,84	19,2	0,71	3,68
3 EPICS XL-MCL	10	71,0	0,80	1,13	18,5	0,39	2,08

ИЗБРАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF and Todd RF, eds. 1995. Leukocyte Typing V. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 262, 263, 268, 270.
2. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. 1984. Leukocyte Typing. New York: Springer-Verlag, pp. 28, 41-42, 44, 196.
3. McMichael AJ, ed. 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, pp. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 170-172, 176, 199, 202, 206, 302-308, 315, 475, 796-801.
4. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821-827.
5. Aiuta F, Cerottini J-C, Coombs RRA, Cooper M, Dickler HB, Froland S, Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig J, Preud'homme J-L, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegal FP, Stjernsward J, Terry WD and Wybran J. 1975. Identification, enumeration and isolation of Band T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies (IUIS), Report - July 1974. Clin Immunol and Immunopathol 3:584-597.
6. Foon KA and Todd RF. 1986. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68:1-31.
7. Drexler HG, Gignac SM and Minowada J. 1988. Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Blut 57: 327-339.
8. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID. 1986. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag, Vol 2: pp.8, 15-25, 37.
9. Newman W, Targan SR and Fast LD. 1984. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. Mol Imm 21:1113-1121.
10. Fabre JW and Williams AF. 1977. Quantitative serological analysis of a rabbit anti-rat lymphocyte serum and preliminary biochemical characterisation of the major antigen recognised. Transplantation 23:349-359.
11. Coffman RL and Weissman IL. 1981. B220: A B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. Nature 289:681-683.
12. Dalchau R and Fabre JW. 1980. Identification with a monoclonal antibody of a predominantly B lymphocyte-specific determinant of the human leukocyte common antigen. J Exp Med 153:753-765.
13. Omary MB, Trowbridge IS and Battifora HA. 1980. Human homologue of murine T200 glycoprotein. J Exp Med 152:842-852.
14. Dalchau R, Kirkley J and Fabre JW. 1981. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. Eur J Immunol 10:737-744.
15. Reinherz EL, Meuer SC and Schlossman SF. 1983. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunol Today 4:5-8.
16. Shaw, S.1994. Leukocyte Differentiation Antigen Database [database]. Version 1.11 [5th International Workshop on Human Leukocyte Differentitation Antigens. Available from Stephen Shaw, National

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Institutes of Health, on disk; NIH ftp site (balrog.nci.nih.gov), Bethesda, MD]
17. Reinherz EL, Hussey RE, Fitzgerald K, Snow P, Terhorst C and Schlossman SF. 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. Nature 294:168-170.
18. Caligiuri M, Murray C, Buchwald D, Levine H, Cheney P, Peterson D, Komaroff AL and Ritz J. 1987. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. J Immunol 139:3306-3313.
19. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR and Schlossman SF. 1985. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. J Immunol 134:1508-1515.
20. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Brown HM and Schlossman SF. 1986. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. Eur J Immunol 16:198-204.
21. Meuer SC, Schlossman SF and Reinherz EL. 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility regions. Proc Natl Acad Sci USA 79:4395-4399.
22. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Somoza C, Williams AF eds. 1993. The Leukocyte Antigen Facts Book. London: Academic Press, pp.106-109.
23. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821-827.
24. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell 30:735-743.
25. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL. 1983. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature 303:808-810.
26. Benjamini E and Leskowitz S. 1991. Immunology: A Short Course. Second Edition. New York: Wiley-Liss, pp. 211-244.
27. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF. 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol 125:1269-1274.
28. Felsenstein D, Carney WP, Iacoviello VR and Hirsch MS. 1985. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152:198-203.
29. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL. 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun 40:472-477.
30. Goldstein G, Lifter J and Mittler R. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. B: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Fabre JW, eds. 1982. New York, NY: Academic Press, pp. 39-70.
31. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM. 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood 74:2203-2211.
32. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, Van Leeuwen E, Capel PJA and Haanen C. 1989. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WTI-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood 74:1152-1158.
33. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB. 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47:465-471.
34. de Martini RM and Parker JW. 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3:56-70.
35. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV. 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2:114-124.
36. Reinherz EL, Hussey RE, Fitzgerald K, Snow P, Terhorst C and Schlossman SF. 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. Nature 294:168-170.
37. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, and Berstein ID. eds. 1986. Leukocyte Typing II, Volume I. New York, NY: Springer-Verlag, p. 8.
38. Beverley PCL and Callard RE. 1981. Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cells antibody. Eur J Immunol 11:329-334.
39. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Edition (H3). Clinical and Laboratory Standards Institute.
40. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA. 1990. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 11:453-459.
41. Nicholson JKA, Hubbard M and Jones, BM. 1996. Use of CD45 fluorescence and side scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 26:16-21.
42. Gebel HM, Lebeck LL, Jensik SC, Landay AL and Bray RA. 1989. Discordant expression of CD3 and T-cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated with OKT3. Transplantation Proceedings 1:1745-1746.
43. Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissensen GW, Karjalainen K and De Le Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In Leukocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H and Kr. von dem Borne AEG, eds. 1989. Oxford: Oxford University Press, pp. 295-296.
44. Schroeder TI and Chatenoud L: Immunological monitoring during treatment with OKT3. Presented under the auspices of the American Society of Transplant Surgeons.
45. Koepke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

CYTO-STAT triCHROME CD45-FITC/CD8-RD1/CD3-PC5
REF 6607017 - 50 тестов (0.5 мл)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

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

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Версия KD, 06/2016

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- Обновленный адрес представительства в ЕС
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Комплект реагентов CYTO-COMP

REF **6607021**
COMP 1 (FITC/RD1) - 50 тестов
COMP 2 (RD1/ECD) - 50 тестов
COMP 3 (RD1/PC5) - 50 тестов
COMP 4 (ECD/PC5) - 50 тестов
Ч.№ 4238053-KF

CE BECKMAN COULTER

РЕАГЕНТЫ ДЛЯ РЕГУЛИРОВКИ НАСТРОЕК ЦВЕТОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МНОГОЦВЕТНОГО АНАЛИЗА НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРЕ

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов CYTO-COMP состоит из четырех двухцветных флуоресцентных реагентов, каждый из которых получен из двух моноклональных антител. Антитела помечены специфическими комбинациями четырех флуорохромов: FITC, RD1, ECD и PC5. Комплект реагентов CYTO-COMP используется с комплектом клеток CYTO-COMP для регулировки настроек цветовой компенсации на проточном цитометре перед выполнением многоцветного анализа с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, RD1, ECD и/или PC5.

Инструкции по приготовлению клеток см. на вкладыше в упаковке комплекта клеток CYTO-COMP (Ч.№ 6607023).

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

Комплект реагентов CYTO-COMP, Ч.№ 6607021

COMP 1 (FITC/RD1) - 50 тестов
COMP 2 (RD1/ECD) - 50 тестов
COMP 3 (RD1/PC5) - 50 тестов
COMP 4 (ECD/PC5) - 50 тестов

КОНЬЮГАТ:

COMP 1:	FITC/RD1 (изотиоцианат флуоресцеина/Фикоэритрин)
COMP 2:	RD1/ECD (Фикоэритрин/ Фикоэритрин-Texas Red)
COMP 3:	RD1/PC5 (Фикоэритрин/ Фикоэритрин-Cy5)
COMP 4:	ECD/PC5 (Фикоэритрин-Texas Red/Фикоэритрин-Cy5)
МОЛЯРНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ:	FITC/белок 3-10 RD1/белок 0,5-1,5 ECD/белок 0,5-1,5 PC5/белок 0,5-1,5

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ:

FITC (зеленый)	Возбуждение при 468-509 nm Излучение при 504-541 nm
RD1 (оранжевый)	Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 568-590 nm
ECD (красный)	Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 610-635 nm
PC5 (темно-красный)	Возбуждение при 486-580 nm Излучение при 660-680 nm

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Кроме антител, в состав реагентов входят 0,2% BSA, 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***techdocs.beckmancoulter.com***.

1. Данные реагенты содержат 0.1% азида натрия. Азид натрия в кислой среде образует азотисто-водородную кислоту, которая является крайне токсичным соединением. Азидные соединения необходимо промывать проточной водой до тех пор, пока они не будут удалены. Данные меры предосторожности рекомендуется выполнять во избежание отложения на металлических трубах азидных соединений, являющихся взрывоопасными. При попадании на кожу или в глаза обильно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
3. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
4. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке комплекта.
5. При хранении и инкубации сведите к минимуму воздействие света на реагенты.
6. При работе с этими реагентами следуйте принципам надлежащей лабораторной практики (GLP).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытые реагенты стабильны до истечения срока годности при хранении при температуре 2-8°C. Открытые флаконы стабильны 180 дней при хранении при температуре 2-8°C. Доведите реагенты до температуры 2-8°C сразу после использования. Не замораживайте. Сведите к минимуму воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических характеристик реагентов (обычно это прозрачная, розовая жидкость) могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагенты использовать нельзя. Перед использованием доведите температуру реагентов до 20-25°C.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Эти реагенты, содержащие моноклональные антитела, можно использовать непосредственно из флакона.

ПРОЦЕДУРА

Подготовка пробы

1. Инструкции по приготовлению клеток см. на вкладыше в упаковке комплекта клеток CYTO-COMP (Ч.№ 6607023).
2. Выберите соответствующие комбинации реагентов COMP для используемого многоцветного приложения.
3. Пипетируйте 10 µL реагентов COMP в отдельные, помеченные тестовые пробирки.
4. Добавьте 100 µL приготовленных клеток CYTO-COMP в каждую тестовую пробирку.
5. Аккуратно перемешайте на вихревом смесителе и инкубируйте при 20-25°C в течение 15 минут.
6. Добавьте 1 mL физиологического раствора с фосфатным буфером в каждую тестовую пробирку.
7. Аккуратно перемешайте на вихревом смесителе.
8. Подготовленные пробы можно хранить при комнатной температуре в темном месте, если проточная цитометрия будет выполнена в течение 2 часов после подготовки. В противном случае закройте пробы и храните в темноте при 2-8°C не дольше 24 часов.

Настройка цветовой компенсации

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован.
2. Проанализируйте пробы с теми же стандартизованными настройками высокого напряжения и усиления, которые использовались с применением многоцветного анализа.
3. Создайте гистограмму зависимости бокового рассеяния от прямого рассеяния с селектором вокруг популяции лимфоцитов. Создайте двухпараметрические гистограммы логарифма флуоресценции, настроив селекцию лимфоциты. Убедитесь, что на двухпараметрических гистограммах логарифма флуоресценции представлены все комбинации флуорохромов, использованные при многоцветном анализе (см. рисунки 1-4).

   На рисунках с 1 по 4 представлены гистограммы клеток CYTO-COMP, окрашенных реагентами CYTO-COMP и проанализированных на проточном цитометре COULTER EPICS XL.

Рисунок 1 Двухпараметрическая гистограмма клеток CYTO-COMP, окрашенных COMP 1 (FITC/RD1) из комплекта реагентов CYTO-COMP (настроена селекция лимфоцитов).

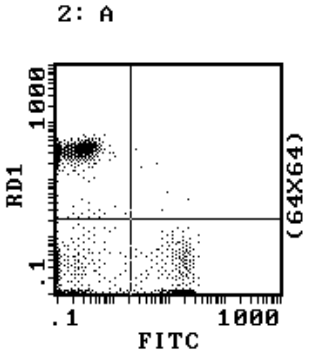
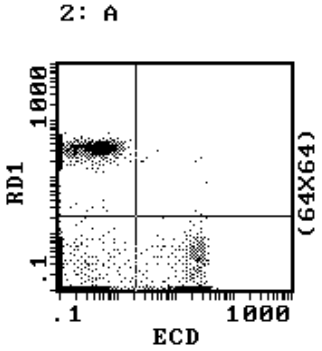


Рисунок 2 Двухпараметрическая гистограмма клеток CYTO-COMP, окрашенных COMP 2 (RD1/ECD) из комплекта реагентов CYTO-COMP (настроена селекция лимфоцитов).



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 3 Двухпараметрическая гистограмма клеток CYTO-COMP, окрашенных COMP 3 (RD1/PC5) из комплекта реагентов CYTO-COMP (настроена селекция лимфоцитов).

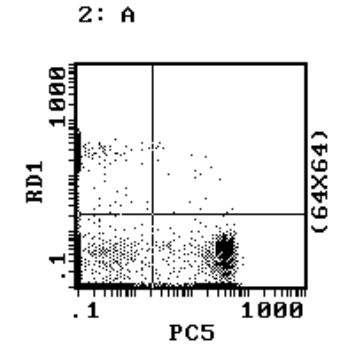
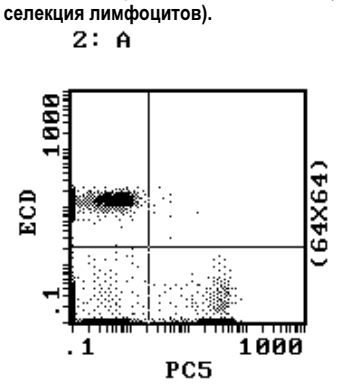


Рисунок 4 Двухпараметрическая гистограмма клеток CYTO-COMP, окрашенных COMP 4 (ECD/PC5) из комплекта реагентов CYTO-COMP (настроена селекция лимфоцитов).



4. Проанализируйте каждую пробу и установите настройки цветовой компенсации таким образом, чтобы квадранты 1 и 3 стали равны (±0,1), а средняя интенсивность в квадрантах 3 и 4 была одинакова (±0,1).
5. Переместите установленные настройки цветовой компенсации в протокол, используемый при многоцветном анализе.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Комплект реагентов CYTO-COMP
REF 6607021

Для получения дополнительной информации или в случае повреждения продукта обращайтесь в службу поддержки клиентов компании Beckman Coulter 800-742-2345 (США или Канада) или обратитесь к региональному представителю компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com (PN C05838).

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

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2017 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

СВЕДЕНИЯ О ПЕРЕРАБОТКЕ И ИСПРАВЛЕНИИ ИЗДАНИЯ

Редакция KE, 06/2016

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- Обновленный адрес представительства в ЕС
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Редакция KF, 09/2017

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Комплект клеток CYTO-COMP
Инструкции по применению

REF 6607023

Ч.№ 4238054-HJ

IVD

ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ РЕГУЛИРОВКИ НАСТРОЕК ЦВЕТОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МНОГОЦВЕТНОГО АНАЛИЗА НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРЕ

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект клеток CYTO-COMP состоит из лиофилизированного препарата человеческих лимфоцитов и буфера для восстановления клеток. Комплект клеток CYTO-COMP используется с комплектом реагентов CYTO-COMP для регулировки настроек цветовой компенсации на проточном цитометре перед выполнением многоцветного анализа с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, RD1, ECD и/или PC5.

Инструкции по окрашиванию и анализу см. на вкладыше в упаковке комплекта реагентов CYTO-COMP (Ч.№ 6607021).

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

Комплект клеток CYTO-COMP,
REF 6607023
Клетки CYTO-COMP - 5 флаконов
Буфер CYTO-COMP - 5 флаконов по 1 mL

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Клетки CYTO-COMP представляют собой лиофилизированный препарат нормальных человеческих лимфоцитов, полученных из периферической цельной крови, в изотоническом растворе.

Буфер CYTO-COMP представляет собой обработанный и разбавленный препарат человеческой сыворотки, содержащий 0,1% NaN_3.

Показания: не применимо.

Противопоказания: не применимо.

Побочные эффекты: не применимо.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs.***

1. **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ - ПОТЕНЦИАЛЬНО БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЙ МАТЕРИАЛ.** Все образцы донорского человеческого материала, использованные при приготовлении этого материала, тестированы способом, утвержденным FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США), на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), и вирусам гепатита C (HCV), а также поверхностного антигена вируса гепатита B. При тестировании получены отрицательные результаты (при повторных исследованиях не получено реактивности). Поскольку ни один метод тестирования не дает полной гарантии отсутствия вируса гепатита B, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), или других инфекционных агентов, с образцом/реагентом следует обращаться, соблюдая уровень биологической безопасности 2, в соответствии с рекомендацией для любых потенциально инфекционных образцов человеческой сыворотки или крови (Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,” 1988).
2. Данный реагент содержит 0,1% азида натрия. Азид натрия в кислой среде образует азотисто-водородную кислоту, которая является крайне токсичным соединением. Азидные соединения необходимо промывать проточной водой до тех пор, пока они не будут удалены. Данные меры предосторожности рекомендуется выполнять во избежание отложения на металлических трубах азидных соединений, являющихся взрывоопасными. При попадании на кожу или в глаза обильно промойте водой.
3. С образцами, пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
4. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
5. Не используйте продукт после истечения срока годности, указанного на этикетке комплекта.
6. При работе с этими реагентами следуйте принципам надлежащей лабораторной практики (GLP).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке комплекта, при хранении при температуре 2-8°C. После восстановления реагент стабилен 7 дней при хранении при температуре 2-8°C. Не замораживайте.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств лиофилизированных клеток (в норме это белый порошок) или буфера (в норме это прозрачная желтоватая жидкость) могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагенты использовать нельзя. Перед использованием доведите температуру реагентов до 20-25°C.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Пипетируйте 1 mL буфера CYTO-COMP во флакон с клетками CYTO-COMP.
2. Перемешайте, аккуратно переворачивая.
3. Перед использованием выдержите клетки 10 минут для стабилизации.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.
2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо третьих лиц, либо непреодолимой силы.
3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер» 109004, г. Москва, ул. Станиславского, д.21, стр.3
Тел./факс, e-mail: (495) 9846730/(495) 228-67-00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Комплект клеток CYTO-COMP,
REF 6607023

Для получения дополнительной информации или в случае повреждения продукта обращайтесь в службу поддержки клиентов компании Beckman Coulter 800-742-2345 (США или Канада) или обратитесь к региональному представителю компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

СВЕДЕНИЯ О ПЕРЕРАБОТКЕ И ИСПРАВЛЕНИИ ИЗДАНИЯ

Редакция HG, 09/2017

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Редакция HH, 07/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Редакция HJ, 10/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5

REF **6607053 - 50 тестов**

Ч.№ 4238051-JF

CE BECKMAN COULTER

	CD8-FITC	CD4-RD1	CD3-PC5
Специфичность	CD8	CD4	CD3
Клон	SFCI21Thy2D3	SFCI12T4D11	UCHT1
Гибридома	NS1 x BALB/c	NS1 x BALB/c	NS1 x BALB/c
Иммуноген	Тимоциты человека[2,20]	Периферические Т-лимфоциты человека[2,14,18,33]	Тимоциты человека и лимфоциты периферической крови, взятые у человека с клеточным лейкозом Сезари[2,32]
Цепь Ig (иммуноглобулинов)	IgG1[2,19,32]	IgG1[2,19,32]	IgG1[2,19,32]
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Кондиционированная среда	Кондиционированная среда	Кондиционированная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждается при 468-509 nm / Излучает на 504-541 nm	Возбуждается при 486-580 nm / Излучает на 568-590 nm	Возбуждается при 486-580 nm / Излучает на 660-680 nm
Конъюгирование	FITC (ФИТЦ, Флуоресцин изотиоцианат)	RD1 (Фикоэритрин)	PC5 (Фикоэритрин-Cy5)
Молярная концентрация	FITC/Белок: 3-10	RD1/Белок: 0,5-1,5	PC5/Белок: 0,5-1,5
Определение светорассеивания	Переднее и (или) боковое	Переднее и (или) боковое	Переднее и (или) боковое

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент с Моноклональными Антителами CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 – это трехцветный флуоресцирующий реагент, включающий три мышиных моноклональных антитела. Все три антитела помечены флуорохромами разных цветов. Реагент одновременно обеспечивает идентификацию и подсчет абсолютного количества CD3+, абсолютного количества CD4+, абсолютного количества CD8+, относительного количества CD3+/CD4+ относительного количества CD3+/CD8+ лимфоцитов в цельной крови методом проточной цитометрии.[1-3] CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56-FITC используется для определения положения селектора лимфоцитов и для проведения измерения нелимфоцитарной примеси в селекторе. Изотипический контроль, CYTO-STAT triCHROME MsIgG1-FITC/MsIgG1-RD1/ MsIgG1-PC5, используется для отслеживания неспецифического мечения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов в периферической крови человека состоит из трех типов клеток: Т (происходящие из тимуса), В (происходящие из костного мозга) и нулевые клетки.[4] Эти типы клеток морфологически неразличимы посредством микроскопии, но могут быть идентифицированы по специфическим антигенным отличиям клеточных мембран.

Т- и В- лимфоциты играют ключевую роль в функционировании иммунной системы. Различные подтипы Т-лимфоцитов могут распознавать специфические антигены, выполнять эффекторные функции и/или управлять как видом, так и интенсивностью клеточных и/или гуморальных иммунных реакций. После активации антигенами или макрофагами посредством Т-лимфоцитов, специфические В-лимфоциты дифференцируются в плазмациты, которые синтезируют и выделяют специфические иммуноглобулины (Ig).

В прошлом Т- и В-лимфоциты идентифицировались и подсчитывались с использованием клеточных маркеров, таких как рецептор для эритроцита барана на Т-лимфоцитах (Е-розетка) и поверхностный мембранный антиген (Sm Ig) на В-лимфоцитах.[5,6] Хотя Е-розетка является специфической для Т-лимфоцитов, ее применение ограничено вследствие того, что она обеспечивает визуальную идентификацию и подсчет комплексов эритроцит барана-Т-лимфоцит вручную лишь посредством оптической микроскопии. Измерение SmIg для идентификации и подсчета В-лимфоцитов также имеет ограничение, заключающееся в том, что другие клеточные популяции могут производить SmIg и/или связывать Ig посредством рецепторов к Fc-фрагменту IgG, что проявляется ложноположительной реакцией.

Позже для идентификации и подсчета Т- и В-лимфоцитов были разработаны моноклональные антитела.[6,7] По сравнению с относительно неспецифическими поликлональными антителами (гетероантисыворотка), которые вырабатываются против этих клеточных популяций, моноклональные антитела связывают специфические Т-клеточные и В-клеточные поверхностные антигены. Это обеспечивает более правильные и точные измерения лимфоцитов, а также идентификацию различных стадий дифференцирования Т-клеток и В-клеток при использовании вместе с другими клеточными маркерами (TdT, HLA-D родственный антиген (человеческий лейкоцитарный антиген), SmIg).

Различные поверхностные антигены экспрессируются и исчезают на Т- и В-лимфоцитах в зависимости от стадии их созревания (дифференцировки) и/или функционального состояния клеткок. Начав экспрессировать антиген, клетка может коэкспрессировать один или несколько из этих антигенов в течение различных периодов времени.

Экспрессия Т-лимфоцитами общих Т-клеточных поверхностных антигенов происходит в следующем порядке: CD7 (ранний протимоцит); CD2 (промежуточный протимоцит); CD5 (незрелый тимоцит), цитоплазматический CD3 (незрелый и промежуточный тимоцит) и CD3 (зрелый тимоцит).[3,7] Затем следует коэкспрессия (обыкновенный тимоцит), а потом специализированная экспрессия (зрелый тимоцит) антигенов клеточной поверхности CD4 (индуктора) и CD8 (супрессора/цитотоксической клетки).[3,7] CD7, CD2, CD5 и CD3 продолжают коэкспрессироваться с CD4 или CD8 в течение всего процесса дифференцировки Т-лимфоцитов, в том числе на покоящихся и активированных зрелых Т-лифоцитах периферической крови или лимфоидной ткани.

Экспрессия В-лимфоцитами общих В-клеточных поверхностных антигенов происходит в следующем порядке: CD19 (коммитированная В-клетка-предшественник/про-В-клетка); CD20 (ранняя пре-В-клетка).[3,7,8]CD19 и CD20 продолжают коэкспрессироваться в течение всего процесса дифференцировки В-лимфоцитов, в том числе и на покоящихся и активированных зрелых В-лифоцитах периферической крови или лимфоидной ткани. Оба антигена исчезают на последней стадии дифференцирования В-лимфоцита, стадии плазматической клетки.

CD21 (покоящийся зрелый В-лимфоцит периферической крови или лимфоидной ткани) и CD22 (пре-В-клетка) представляют эволюционно стабильные (консервативные) антигены В-клеточной поверхности, которые теряются зрелым В-лимфоцитом периферической крови или лимфоидной ткани в процессе активации.[3,8] Поверхностная экспрессия CD22 предваряется цитоплазматической экспрессией CD22 (про-В-клетка).

Реагент с моноклональными антителами, специфический для общегоТ-клеточного и общего В-клеточного поверхностного антигена, может быть использован для идентификации и подсчета зрелых Т- и В-лимфоцитов соответственно. Реагент с моноклональными антителами, специфическими для конкретного антигена клеточной поверхности, также может быть использован для определения созревания (дифференцировки) и/или функционального состояния популяции лимфоцитов. Настоящий тест использует моноклональные антитела CD3, CD4 и CD8 для идентификации и подсчета поверхностных антигенов зрелой Т, индуктора Т и супрессора/цитотоксического Т-лимфоцита в периферической крови посредством специфического связывания с поверхностными антигенами недифференцированной Т-клетки, Т-клетки-индуктора, Т-клетки-супрессора/ цитотоксической клетки, CD3, CD4 и CD8 соответственно.

CD3

Антитело к антигену CD3 является специфическим для эпсилон-цепи состоящего из пяти цепей компонента CD3 TCR комплекса.[3,9] Молекулярная масса этой цепи составляет 20 kd.[9] Это специфический для клеточной линии общий для Т-клеток антиген, в норме экспрессирующийся на поверхности зрелых тимоцитов и на покоящихся и активированных зрелых Т-лимфоцитах периферической крови (как в популяциях индукторов, так и супрессоров и цитотоксических клеток).[10-12]

CD4

Антиген CD4 имеет молекулярную массу 62 kd.[3,13] Он присутствует на тимоцитах и популяции индукторов Т-лимфоцитов периферической крови.[13,14] Также в небольшом количестве он экспрессируется моноцитами.[15] CD4+-лимфоциты играют ключевую роль в регуляции иммунной реакции.[16,17] В

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

периферической крови CD4+-лимфоциты выполняют функцию индуктора для взаимодействий Т-Т, Т-В и Т-макрофаг.[18] Антиген CD4 вступает в реакцию с антигеном главного комплекса гистосовместимости (MHC) II класса на клетках-мишенях.[13,18]

CD8

Антиген CD8 имеет молекулярную массу 68 kd.[3,19] Обычно он присутствует приблизительно на 80% тимоцитов и приблизительно 30-35% Т-лимфоцитов периферической крови, а также на некоторых Т-киллерах (NK).[13,20,21] CD8+-лимфоциты играют ключевую роль в регуляции иммунной реакции посредством супрессорного (подавляющего) и цитотоксического действия.[16-18] Антиген CD8 вступает в реакцию с антигеном главного комплекса гистосовместимости (MHC) I класса на клетках-мишенях.[13,18]

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

CD3+, CD4+ и/или CD8+ лимфоциты

Количества CD3+, CD4+ и/или CD8+ лимфоцитов в процентах и абсолютные количества могут быть полезны для оценки иммунного статуса, сопутствующего известным или неизвестным болезненным состояниям, а также для отслеживания уровней лимфоцитов после трансплантации органов.[22-29]

Например, идентификация аномальных уровней CD3+, CD4+ и/или CD8+ лимфоцитов может помочь в диагностике и/или прогнозировании различных аутоиммунных заболеваний, связанных с изменением количества белых клеток крови (лейкоцитов). Изменения количества CD3+, CD4+ и/или CD8+ лимфоцитов в процентах, зарегистрированные после трансплантации органа (например, почки), обусловливают применение измерений CD3+, CD4+ и/или CD8+ лимфоцитов при отслеживании изменений в этих клеточных популяциях.

Идентификация аномальных уровней CD4+ лимфоцитов также может быть полезной при диагностике и прогнозировании иммунодефицитного состояния. Например, действие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), этиологического фактора синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) заключается в значительной иммуносупрессии преимущественно вследствие селективного истощения CD4+ лимфоцитов, которые осуществляют экспрессию рецептора вируса (антигена CD4).[15, 30] Прогрессирующему клиническому и иммунологическому ухудшению обычно соответствует падение количества CD4+ лимфоцитов.[15]

Соотношение Т4/Т8

Связанные с заболеванием изменения в уровнях CD4+ и/или CD8+ лимфоцитов могут изменить соотношения Т4/Т8 числа: индукторов: супрессоров/цитотоксических клеток. Следовательно, соотношения Т4/Т8 могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических индикаторов состояния иммунной системы.

В качестве лабораторных параметров для оценки СПИД-ассоциированного комплекса и СПИДа наиболее широко применялись соотношения Т4/Т8 вместе с соответствующими количествами CD4+ клеток лимфоцитов.[15,31] Соотношения Т4/Т8 падают до нуля у пациентов с запущенным СПИДом, при этом уровни CD4+ лимфоцитов не выявляются.[15] В подобных случаях уровни CD8+ лимфоцитов могут быть нормальными, повышенными или пониженными.

Пониженные уровни CD4+ лимфоцитов и повышенные уровни CD8+ лимфоцитов в процентах без значительных изменений в соотношениях Т4/Т8 наблюдались у пациентов со стабильной функцией почечного аллотрансплантата после трансплантации.[29] Кроме того, малые соотношения Т4/Т8 и пониженные уровни CD4+ лимфоцитов в процентах были зарегистрированы у пациентов во время фенотипического восстановления, сопровождающего аутологичную трансплантацию костного мозга.[27,28]

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Данный тест основывается на способности моноклональных антител связываться с поверхностью клеток, осуществляющих экспрессию отдельных эпитопов. CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 является комбинацией из трех мышиных моноклональных антител, специфических для различных поверхностных клеточных антигенов. Специфическое мечение клетки производится посредством инкубации цельной крови с трехцветным реагентом CYTO-STAT triCHROME. Вторая проба цельной крови, меченная CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56-FITC, используется для оценки чистоты работы лимфоцитарного селектора. Другая проба цельной крови, меченная изотипическим контролем CYTO-STAT triCHROME MsIgG1-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5, используется для оценки неспецифической фоновой флуоресценции. Красные кровяные клетки лизируются, а оставшиеся белые кровяные клетки анализируются путем проточной цитометрии с использованием селектора лимфоцитов. На первой гистограмме селектор лимфоцитов определяется как имеющий низкий сигнал переднего светорассеяния Forward Scatter (FS) и низкий сигнал бокового светорассеяния Side Scatter (SS). На второй гистограмме процент положительно окрашенных клеток определяется для четырех квадрантов: CD3-/CD4+ (только положительная флуоресценция RD1), CD3+/CD4+ (положительная флуоресценция PC5/RD1), CD3-/CD4- (отрицательная флуоресценция PC5/RD1) и CD3+/CD4- (только положительная флуоресценция PC5). На третьей гистограмме процент положительно окрашенных клеток определяется для четырех квадрантов: CD3-/CD8+ (только положительная флуоресценция FITC), CD3+/CD8+ (положительная флуоресценция PC5/FITC), CD3-/CD8- (отрицательная флуоресценция PC5/FITC) и CD3+/CD8- (только положительная флуоресценция PC5).

РЕАГЕНТ

Смотрите таблицу странице 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТА

Концентрация антител — 0,25/0,25/0,5 µg/тест.

Кроме антител, в реагент входят 0,2% БСА, 0,01 М фосфата калия, 0,15 М NaCl, 0,1% NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

1. Этот реагент содержит 0,1% азида натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, которая является исключительно токсичным соединением. Во время утилизации соединения азида следует смывать проточной водой. Рекомендуется соблюдать эти меры предосторожности во избежание образования отложений в металлических трубах, что может создавать взрывоопасные условия. При попадании в глаза или на кожу, тщательно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми материалами, соприкасающимися с ними, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
3. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта проб с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не используйте реагент после истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. Минимизируйте воздействие света на реагент при его хранении и инкубации.
6. Избегайте бактериального загрязнения реагентов, так как оно может привести к ошибочным результатам.
7. Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этим реагентом.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Открытый реагент сохраняет стабильность в течение 90 дней после вскрытия при хранении при температуре 2-8°C. Сразу после использования вернуть реагенты в условия с температурой 2-8°C. Не замораживать. Минимизируйте попадание света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

На разрушение может указывать любое изменение физических свойств реагента (нормальный вид – прозрачная жидкость розового цвета) или значительные колебания показателей, полученных для контрольных образцов; в таком случае использовать реагент не следует.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Данный реагент CYTO-STAT triCHROME используется прямо из флакона.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

ВНИМАНИЕ: Стабильность проб крови очень изменчива. Для получения оптимальных результатов начинайте анализ в течение 6 часов после венепункции. Непомеченная, предохраняемая от свёртывания кровь до начала процедуры должна храниться при температуре 20-25°C. Не охлаждайте.

Заберите венепункцией в асептических условиях образец венозной крови в пробирку для забора крови, используя соответствующий антикоагулянт (рекомендуется ЭДТА).[34] Для каждого теста требуется 100 µL цельной крови. Заберите достаточное количество крови (от 1 до 2 mL на пробирку) для проведения теста и постановки контроля и храните аутологичную плазму на случай, если будет необходимо развести пробу. Подсчёт белых кровяных клеток и проверка жизнеспособности клеток должны быть проведены в соответствии с установленной лабораторной процедурой для каждого образца венозной крови. Рекомендуемая жизнеспособность клеток ≥90%, но её может быть сложно добиться в некоторых аномальных образцах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ CYTO-STAT triCHROME

ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5
REF 6607053 – 50 тестов (0,5 mL)

ТРЕБУЮЩИЕСЯ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Реагент лизиса эритроцитов (по требованию):

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

Разбавитель (при необходимости) Аутологичная плазма

ИЛИ

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

Разбавитель (при необходимости) Аутологичная плазма

CYTO-STAT triCHROME MsIgG1-FITC/MsIgG1-RD1/ MsIgG1-PC5, Ч.№ 6607054 – 50 тестов (0,5 mL)

CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56 (T200)-FITC, Ч.№ 6603909 – 50 тестов (0,5 mL)

Дополнительные реагенты

Флуоросферы Flow-Count, Ч.№ 7547053 - 200 тестов (20 mL)

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

Набор клеток CYTO-COMP, Ч.№ 6607023 – 50 тестов

Набор реагентов CYTO-COMP, Ч.№ 6607021 – 50 тестов

тест-пробирки 12 x 75 mm

Пробирки для забора крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Пипетки для переноса

Пастеровские пипетки

Микропипетки

Вихревой смеситель

Проточный цитометр (Обратитесь к главе Требуемое оборудование)

Счётчик клеток или гематицитометр

Фильтр (для COULTER EPICS XL/XL-MCL только с 3 датчиками флуоресценции) Ч.№ 6915056

Ватные палочки

ТРЕБУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

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

ПРОЦЕДУРА

1. Оптимальное мечение достигается при количестве белых кровяных клеток в диапазоне 3-10 x 10^3 клеток/µL. Если количество белых кровяных клеток превышает 10 x 10^3 клеток/µL, требуется разбавление, если же количество белых кровяных клеток меньше, чем 3 x 10^3 клеток/µL, требуется центрифугирование и ресуспендирование, для получения количества клеток в диапазоне 3-10 x 10^3 клеток/µL.

   Аутологичная плазма рекомендуется в качестве растворителя при использовании Системы реагентов COULTER Q-PREP/ IMMUNOPREP, Системы реагентов COULTER MULTI-Q-PREP/IMMUNOPREP или Системы реагентов COULTER TQ-Prep/IMMUNOPREP.

   Аномальные пробы

   a. Большое количество белых кровяных клеток (>10 x 10^3 клеток/µL)
      10-20 x 10^3: Разведите кровь в соотношении 1:2.
      20-30 x 10^3: Разведите кровь в соотношении 1:3.
      30-40 x 10^3: Разведите кровь в соотношении 1:5.
      40-60 x 10^3: Разведите кровь в соотношении 1:6.
      60-100 x 10^3: Разведите кровь в соотношении 1:10.
      100-200 x 10^3: Разведите кровь в соотношении 1:20.
   b. Малое количество белых кровяных клеток (<3 x 10^3 клеток/µL)
      1) Ценрифугируйте кровь при температуре 20-25°C при 500 x g в течение 5 минут.
      2) Снимите лейкоцитную плёнку с помощью пастеровской пипетки, забирая часть красных кровяных клеток и плазмы, чтобы быть уверенным, что извлечены все белые кровяные клетки.
      3) Полностью ресуспендируйте клетки, несколько раз перемешав пастеровской пипеткой.
      4) Определите концентрацию клеток, используя счётчик клеток или гемацитометр.
      5) Доведите разбавителем концентрацию клеток до 10 x 10^3 клеток/µL.
2. Для каждой пробы промаркируйте тест-пробирки 12 x 75 mm – две с моноклональными антителами, одну с изотипическим контролем. Добавьте 10 µL CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56-FITC or CYTO-STAT triCHROME MsIgG1-FITC/ MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 изотипического контроля или CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5 в промаркированную соответствующим образом тест-пробирку.
3. Добавьте по 100 µL венозной крови в каждую тест-пробирку. Необходимо проявить внимательность, чтобы не допустить загрязнение кровью краев и стенок тест-пробирок, иначе может произойти неполный лизис.
4. Аккуратно смешайте, пользуясь вращательной мешалкой. Осуществите инкубацию реакционных смесей при температуре 20-25°C на 10-12 минут.

ВАЖНО: Если капли реагента остаются краю тест-пробирки, их следует удалить, иначе нелизированные красные кровяные клетки могут загрязнить образец и исказить результаты. Для их удаления можно использовать ватную палочку.

5. Лизируйте красные кровяные клетки в каждой тест-пробирке, применяя процедуру, рекомендованную для выбранного метода лизиса (Система реагентов COULTER Q-PREP/IMMUNOPREP, Система реагентов COULTER MULTI-Q-PREP/ IMMUNOPREP или Система реагентов COULTER TQ-Prep/IMMUNOPREP).
6. Проанализируйте клетки на проточном цитометре, позволяющем проводить многоцветный флуоресцентный анализ, должным образом стандартизированном и с использованием селектора лимфоцитов, согласно ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА ПРОБЫ, описанной ниже.
   Чтобы минимизировать вероятность неоптимальных результатов, анализируйте помеченные клетки сразу.
   a. Результаты флуоресцентной проточной цитометрии должны быть нанесены на логарифмическую шкалу.
   b. Сигналы переднего светорассеяния Forward Scatter (FS) и бокового светорассеяния Side Scatter (SS) должны быть нанесены на линейную шкалу.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ДЛЯ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Убедитесь, что цитометр правильно выровнен и стандартизирован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции, согласно рекомендациям производителя (обратитесь к Руководству по эксплуатации прибора).

Флуорохромы флуоресцеин изотиоцианат (FITC), фикоэритрин (RD1) и фикоэритрин-Cy5 (PC5) излучают на разных длинах волн, тем не менее, имеется частичное перекрытие спектров, которое должно быть скорректировано электронной компенсацией. Оптимальные уровни компенсации могут быть определены путем анализа клеток-доноров, помеченных каждым из флуорохромов независимо от других, на двухпараметрической гистограмме. С другой стороны, Клетки CYTO-COMP могут быть помечены соответствующим сочетанием флуорохромов из Набора реагентов CYTO-COMP. И в том, и в другом случае чтобы убедиться, что в двухцветном квадранте (квадрант 2) не происходит мечения каким-либо отдельным флуорохромом, производится регулировка. Контрольные клетки COULTER CYTO-TROL, помеченные CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5, могут использоваться для проверки установок компенсации.

Перед тем как проводить анализ проб, следует пометить контрольные пробы (например, для Контрольных клеток COULTER CYTO-TROL), чтобы убедиться в реакционной способности антител.

Специфические и/или неспецифические антитела, связывающиеся с моноцитами и гранулоцитами в пробе, могут быть исключены при правильном использовании селектора лимфоцитов на проточном цитометре.[35]

Реагент CD14/CD45 с моноклональными антителами, CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56 (T200)-FITC, запускается для каждого образца, чтобы установить надлежащие настройки селектора лимфоцитов для правильного исключения моноцитов.

Изотипический контроль CYTO-STAT triCHROME MsIgG1-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 используется, чтобы определить положение курсора для учета неспецифического связывания Fc фрагмента антител с лимфоцитами пробы. Курсоры располагаются таким образом, чтобы включить 98% (номинальное значение) неспецифической флуоресценции в квадрант 3. Неспецифическая флуоресценция в квадрантах 1, 2 и 4, для любой контрольной пробы, обычно ограничиваются 1-2% или менее для здорового человека (если это значение превосходит 1-2%, результаты теста могут быть ошибочными). Более высокие значения могут обнаружиться при некоторых неопластических заболеваний.

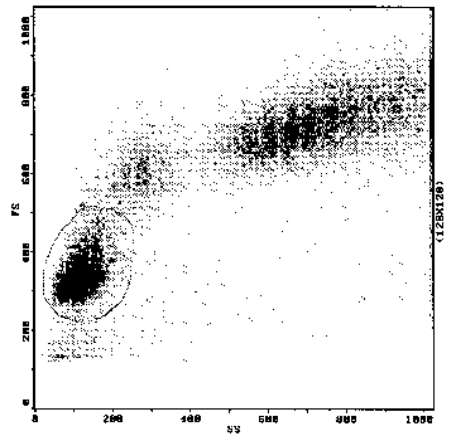
ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА ПРОБЫ

ВНИМАНИЕ: Если лазер проточного цитометра смещен, или установлены неподходящие фильтры, или же неправильно настроены селекторы, результаты могут быть ошибочными.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Для пробирки с Mo2-RD1/KC56-FITC выведите двухпараметрическую гистограмму SS (90°LS) к FS. Может быть получен трехчастный дифференциал. Установите селектор для лимфоцитов с низким FS и низким SS (см. Рисунок 1). Оптимизируйте селектор лимфоцитов для чистоты и восстановления лимфоцитов (обратитесь к вкладышу на упаковке CYTO-STAT/COULTER CLONE Mo2-RD1/ KC56-FITC).

Рисунок 1. Двухпараметрическая гистограмма SS к FS для идентификации лимфоцитов (селектор A).



2. Для изотипического контроля составьте двухпараметрическую гистограмму с использованием MsIgG1-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) MsIgG1-RD1 (FL2 LOG) и селектора лимфоцитов (см. Рисунок 2). Установите Quad Stats, чтобы определить 98% (номинальное значение) неспецифического мечения используям изотипический контроль. Выведите вторую двухпараметрическую гистограмму с использованием MsIgG1-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) MsIgG1-FITC (FL1 LOG) и селектора лимфоцитов (см. Рисунок 3). Установите Quad Stats, чтобы определить 98% (номинальное значение) неспецифического мечения используя изотипический контроль.

Рисунок 2. Двухпараметрическая гистограмма MsIgG1-PC5 к MsIgG1-RD1, использовавшаяся для определения Quad Stats 98% (номинального значения) неспецифического мечения с применением селектора лимфоцитов.

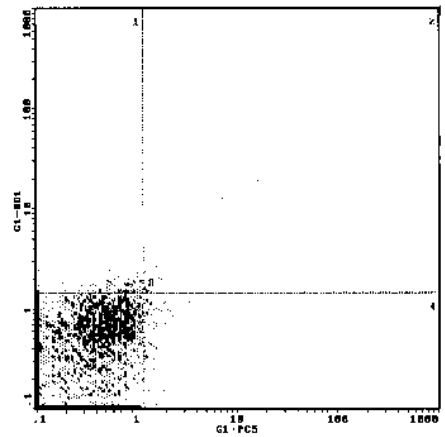
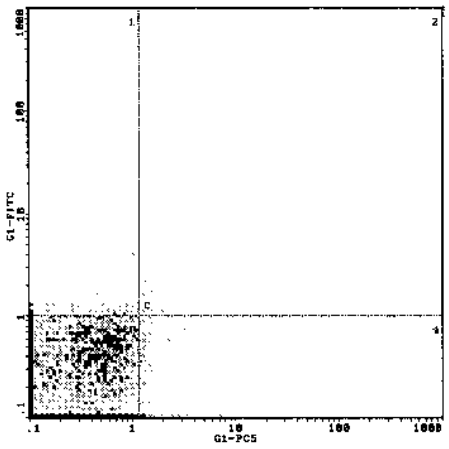


Рисунок 3. Двухпараметрическая гистограмма MsIgG1-PC5 к MsIgG1-FITC, использовавшаяся для определения Quad Stats для 98% (номинального значения) неспецифического мечения с применением селектора лимфоцитов.



3. Для анализа проб используйте Quad Stats, определенные с помощью изотипического контроля, и постройте двухпараметрическую гистограмму на основе CD3-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) и CD4-RD1 (FL2 LOG) и с использованием селектора лимфоцитов (см. Рисунок 4) и гистограмму на основе CD3-PC5 (FL3 LOG или FL4 LOG) CD8-FITC (FL1 LOG) и с использованием селектора лимфоцитов (см. Рисунок 5).

Следующие гистограммы представляют примеры проб цельной крови в норме, помеченных CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5, лизированных Системой реагентов MULTI-Q-PREP/ IMMUNOPREP и проанализированных с помощью проточного цитометра COULTER EPICS XL-MCL (4 датчика флуоресценции) с использованием селектора лимфоцитов (см. Рисунки 4 и 5). Quad Stats были установлены, чтобы определить 98% (номинальное значение) неспецифического мечения с использованием изотипического контроля.

На Рисунке 4 общее количество CD3-положительных клеток в процентах рассчитано путем сложения значений в квадрантах 2 и 4. Общее количество CD4-положительных клеток в процентах рассчитано путем сложения значений в квадрантах 1 и 2. Количество CD3+/CD4+ в процентах получено прямо из квадранта 2. На Рисунке 5 общее количество CD3-положительных клеток в процентах рассчитано путем сложения значений в квадрантах 2 и 4. Общее количество CD8-положительных клеток в процентах рассчитано путем сложения значений в квадрантах 1 и 2. Количество CD3+/CD8+ в процентах получено прямо из квадранта 2.

Рисунок 4. Двухпараметрическая гистограмма CD3-PC5 к CD4-RD1 с использованием селектора лимфоцитов и Quad Stats, основанных на изотипическом контроле.

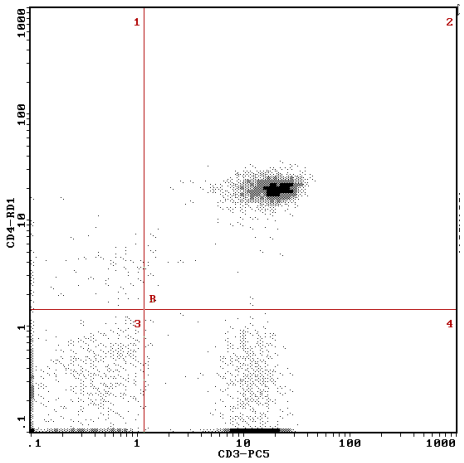
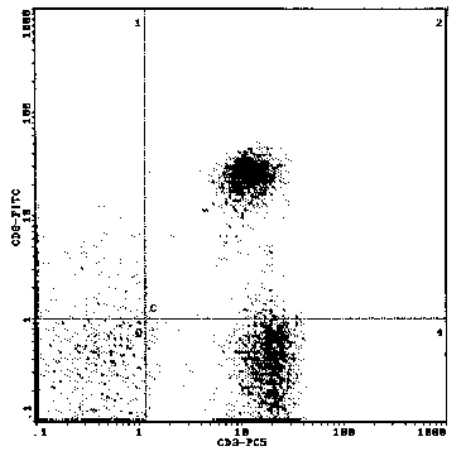


Рисунок 5. Двухпараметрическая гистограмма CD3-PC5 к CD8-FITC с использованием селектора лимфоцитов и Quad Stats, основанных на изотипическом контроле.



АБСОЛЮТНЫЕ КОЛИЧЕСТВА

Абсолютные количества могут быть получены двумя методами. Стандартный (непрямой) метод для расчета абсолютных количеств сочетает результаты гематологии и проточной цитометрии и основан на следующей формуле:

Абсолютное количество (клетки/µL) = Общее количество белых клеток крови (клетки/µL) x % лимфоцитов x % положительно окрашенных клеток ÷ 10^4

В основе метода Flow-Count (прямого) лежит использование флуоросфер Flow-Count для непосредственного определения абсолютных количеств и следующая формула:

Абсолютное количество (клетки/µL) = (Общее количество подсчитанных клеток ÷ Общее количество подсчитанных флуоросфер Flow-Count) × Аналитическая концентрация флуоросфер Flow-Count

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Для получения оптимальных результатов образцы должны быть помечены в течение 6 часов после отбора. Перед мечением и анализом храните образцы в пробирках для забора крови при комнатной температуре. Не охлаждайте. Охлажденные образцы могут давать аномальные результаты.
2. Чтобы минимизировать вероятность неоптимальных результатов, анализируйте меченые клетки сразу.
3. Рекомендуемая жизнеспособность клеток ≥90%, но её может быть сложно добиться в некоторых аномальных образцах.
4. Длительное воздействие на клетки лизирующими реагентами может вызвать разрушение белых клеток крови и потери клеток в исследуемой популяции.
5. Часть красных кровяных клеток может не пройти лизис в следующих случаях: ядросодержащие красные клетки крови, аномальная концентрация белка или гемоглобинопатии могут вызвать ошибочно заниженные результаты из-за учета нелизированных красных клеток крови как лейкоцитов.
6. Данный реагент разработан для использования с препаратами цельной крови. Он может использоваться с Контрольными клетками COULTER CYTO-TROL препарата лиофилизированных лимфоцитов. Не рекомендуется использовать со свежими или замороженными препаратами мононуклеарных клеток.
7. Не следует разбавлять, разводить на аликвоты или замораживать этот реагент. Использовать только в упаковке.
8. Этот реагент предназначен только для использования при проточной цитометрии.
9. Аномальные состояния здоровья не всегда выражаются в аномальном процентном количестве определенных популяций лейкоцитов. У человека в аномальном состоянии могут быть обнаружены те же процентные количества лейкоцитов, что и у здорового. Используйте тест с учетом клинических и других диагностических данных.
10. С некоторыми пациентами могут возникнуть определенные сложности из-за измененных или очень небольших количеств некоторых клеточных популяций.
11. Анализ для некоторых пациентов, подвергающихся лечению OKT3, при помощи реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 может быть неверным.[36-38]
12. Результаты, полученные при проточной цитометрии, могут быть ошибочными, если лазер смещен или селектор настроен неверно.
13. Вследствие неприемлемости расхождений, выявляемых при сравнении методик различных лабораторий для определения абсолютного количества лимфоцитов, необходимо провести оценку точности используемого метода.[39]

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Образцы цельной крови были взяты у практически здоровых мужчин и женщин. В группу вошли люди из центрально-западного региона Соединенных Штатов в возрасте 18-85 лет (n = 56), раса не учитывалась. Пробы были окрашены моноклональным антителом CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5. Значения, определенные при помощи проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов), представляют абсолютное количество CD3+, абсолютное количество CD4+, абсолютное количество CD8+, относительное количество CD3+/CD4+ клеток и относительное количество CD3+/CD8+ клеток и даны в следующей таблице. Общее количество белых клеток и пятичастный дифференциал были получены для каждого образца. Абсолютные количества определялись при помощи стандартного (непрямого) метода. Значения были скорректированы для чистоты лимфоцитов (Пределы селектора лимфоцитов: селекция ≥90% и чистота ≥85%). Величины выражены в процентах от общего количества лимфоцитов и в виде абсолютных количеств (клетки/µL).

Эти значения приведены только как образец. Каждая лаборатория должна установить свои собственные ожидаемые значения по отдельно взятой группе здоровых доноров.

ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ В НОРМЕ

%+ Лимфоцитов	n	Минимум	Максимум	Среднее ±1CO
CD3+	56	66	93	79,7 ±6,1
CD4+	56	39	76	54,2 ±7,7
CD8+	56	16	43	28,0 ±6,1
CD3+/CD4+	56	38	75	53,5 ±7,7
CD3+/CD8+	56	10	40	24,2 ±6,0
Абсолютное количество				
CD3+	56	769	2045	1431 ±332
CD4+	56	437	1627	969 ±239
CD8+	56	236	895	502 ±159
CD3+/CD4+	56	431	1618	957 ±239
CD3+/CD8+	56	163	789	437 ±150

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD3 в норме присутствует на клеточной поверхности зрелых тимоцитов, а также находящихся в покое и активированных зрелых Т-лимфоцитов периферической крови (и индуктор, и супрессор/цитотоксические популяции).[10-12]

Антиген CD4 присутствует на тимоцитах и популяции индукторов Т-лимфоцитов периферической крови.[13,14] Также в небольших количествах он экспрессируется на моноцитах.[15]

Антиген CD8 в норме присутствует приблизительно на 80% тимоцитов и приблизительно 30-35% Т-лимфоцитов периферической крови, а также некоторых Т-киллерах (NK).[13,20,21]

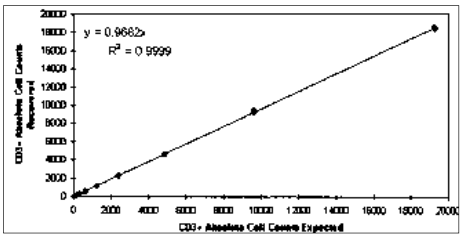
Чтобы оценить перекрёстную реактивность клеток, моноклональное антитело CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 подверглось испытаниям с использованием образцов крови здоровых взрослых доноров. Результаты показали, что моноклональные антитела CD3, CD4 и CD8 вступают в специфическую реакцию с соответствующей популяцией лимфоцитов. Моноциты тускло окрашиваются CD4 моноклональным антителом, содержащимся в реагенте.

За описанием того, как определить специфическое и неспецифическое мечение моноклональным антителом CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5, обратитесь к разделу ПРОЦЕДУРА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА.

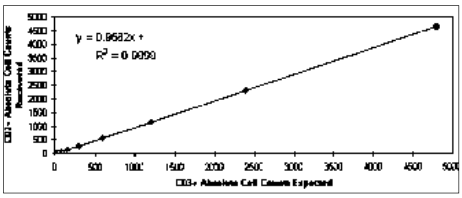
ЛИНЕЙНОСТЬ

Для каждого из 12 последовательных разведений концентрированного образца Контрольных клеток COULTER CYTO-TROL были проведены три повторных измерения для получения ряда концентраций CD3+, CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Клетки были помечены реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 и проанализированы посредством проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов). См. графики ниже.

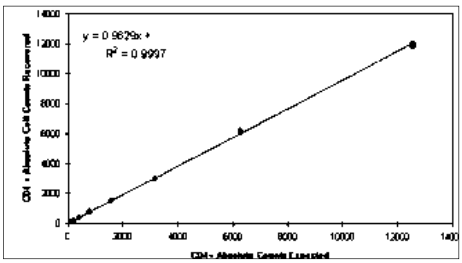
Полный диапазон CD3+ лимфоцитов



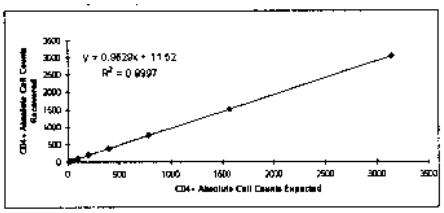
Увеличение низкого диапазона CD3+ лимфоцитов



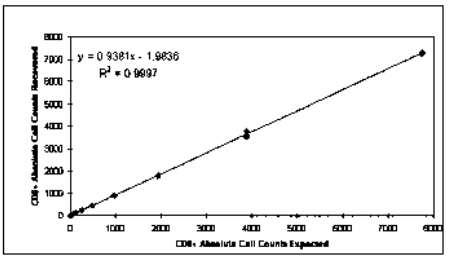
Полный диапазон CD4+ лимфоцитов



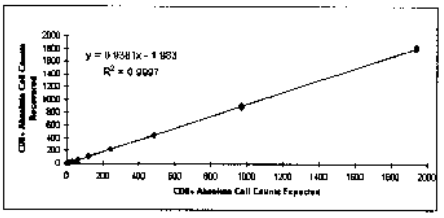
Увеличение низкого диапазона CD4+ лимфоцитов



Полный диапазон CD8+ лимфоцитов



Увеличение низкого диапазона CD8+ лимфоцитов



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА

Степень согласованности между реагентами на моноклональных антителах CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 и компаратором CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3-ECD/T4-RD1/T8-RD1 изучалась на пробах лизированной цельной крови в норме и при патологии с помощью проточной цитометрии (COULTER EPICS XL-MCL с использованием селектора лимфоцитов). Эти данные представлены в таблице и на рисунках ниже и основываются на предположении, что реагенты обладают одинаковой реакционной способностью по отношению к зрелым Т-лимфоцитам крови, Т-лимфоцитам индукторам и супрессорам/цитотоксическим Т-лимфоцитам. Величины выражены в процентах от общего количества лимфоцитов. Значения были скорректированы для чистоты лимфоцитов (Пределы селектора лимфоцитов: селекция ≥90% и чистота ≥85%).

CD3+ Лимфоциты

Реагент	n	Минимум	Максимум	Среднее ±1CO
CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5	114	53	99	81,7 ±8,1
CD3-ECD/T4-RD1/T8-FITC	114	57	99	82,7 ±8,0

CD4+ Лимфоциты

Реагент	n	Минимум	Максимум	Среднее ±1CO
CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5	114	7	76	39,5 ±17,0
CD3-ECD/T4-RD1/T8-FITC	114	7	73	39,0 ±17,0

CD8+ Лимфоциты

Реагент	n	Минимум	Максимум	Среднее ±1CO
CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5	114	16	79	43,4 ±18,3
CD3-ECD/T4-RD1/T8-FITC	114	16	79	44,2 ±18,3

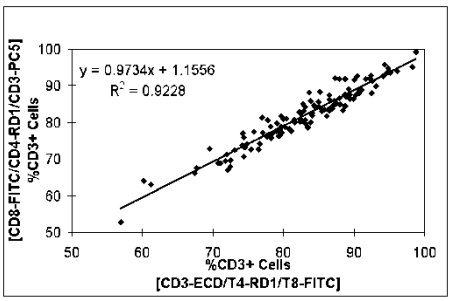
CD3+/CD4+ Лимфоциты

Реагент	n	Минимум	Максимум	Среднее ±1CO
CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5	114	7	75	38,7 ±19,1
CD3-ECD/T4-RD1/T8-FITC	114	6	73	38,3 ±17,0

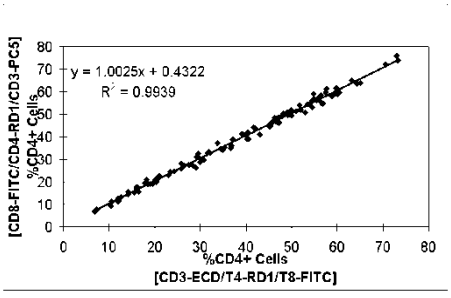
CD3+/CD8+ Лимфоциты

Реагент	n	Минимум	Максимум	Среднее ±1CO
CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5	114	10	78	40,5 ±19,1
CD3-ECD/T4-RD1/T8-FITC	114	10	79	40,9 ±18,9

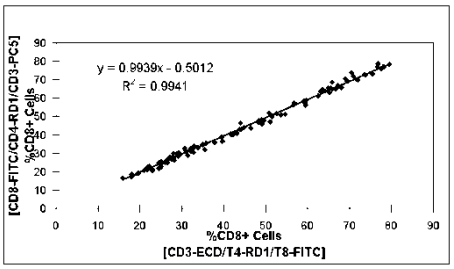
Регрессионный анализ: CD3+ Лимфоциты



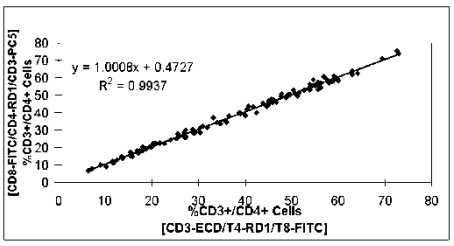
Регрессионный анализ: CD4+ Лимфоциты



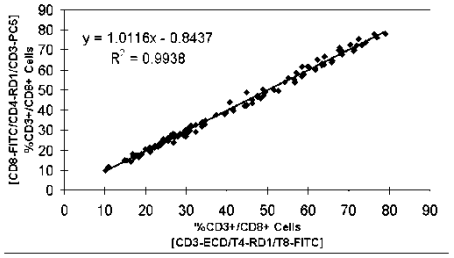
Регрессионный анализ: CD8+ Лимфоциты



Регрессионный анализ: CD3+/CD4+ Лимфоциты



Регрессионный анализ: CD3+/CD8+ Лимфоциты



ТОЧНОСТЬ

Сходимость (Внутрилабораторная)

Десять повторных измерений для каждого из трех уровней концентраций лимфоцитов CD3+ и CD4+ и CD8+ были проведены на проточном цитометре COULTER EPICS XL-MCL. Снижение числа клеток было произведено на образце цельной крови в норме с использованием ферромагнитных частиц, соединенных с моноклональными антителами, для генерации различных уровней. Пробы были помечены реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5. Величины выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

Уро-вень	n	Сре-дний %CD3+	±1CO	%КИ	Сре-дний %CD4+	±1CO	%КИ	Сре-дний %CD8+	±1CO	%КИ
1	10	45,5	0,66	1,46	10,9	0,53	4,84	11,0	0,35	3,16
2	10	77,9	1,49	1,91	57,7	1,14	1,97	27,4	0,81	2,94
3	10	86,0	0,65	0,75	74,7	0,52	0,70	64,2	0,34	0,52

Межлабораторная

Измерения проводились в один и тот же день тремя отдельными лабораториями из Корпорации Coulter с использованием трех различных проточных цитометров. На каждом приборе было проведено десять повторяющихся измерений. Для всех измерений использовался один образец крови, полученной от здорового донора цельной крови человека. Образец крови был разделен на три части, и каждая лаборатория произвела мечение образца реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5. Величины выражены в процентах от общего количества лимфоцитов.

Лаборатория/прибор	n	Сре-дний % CD3+	±1CO	%КИ	Сре-дний % CD4+	±1CO	%КИ	Сре дний % CD8+	±1CO	%КИ
1 EPICS XL	10	72,6	0,56	0,77	52,3	0,50	0,97	20,9	0,61	2,90
2 EPICS XL	10	73,3	0,71	0,97	53,1	0,56	1,06	20,8	0,46	2,22
3 EPICS XL	10	73,4	0,56	0,76	53,1	0,66	1,24	21,1	0,62	2,94

ИЗБРАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF and Todd RF, eds. 1995. Leukocyte Typing V. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 262, 263, 268.
2. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. 1984. Leukocyte Typing. New York, NY:Springer-Verlag, pp. 28, 41-42, 44, 196.
3. McMichael AJ, ed. 1987. Leukocyte Typing III. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 170-172, 176, 199, 206, 302-308, 315, 475.
4. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821-827.
5. Aiuta F, Cerottini J-C, Coombs RRA, Cooper M, Dickler HB, Froland Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig J, Preud'homme J-L, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegal FP, Stjernsward J, Terry WD and Wybran J. 1975. Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies (IUIS), Report - July 1974. Clin Immunol and Immunopathol 3:584-597.
6. Foon KA and Todd RF. 1986. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68:1-31.
7. Drexler HG, Gignac SM and Minowada J. 1988. Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Blut 57:327-339.
8. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID. 1986. Leukocyte Typing II. New York, NY: Springer-Verlag, Vol 2: pp. 8, 15-25.
9. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Somoza Williams AF eds. 1993. The Leukocyte Antigen Facts Book. London, UK: Academic Press, pp.106-109.
10. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821-827.
11. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell 30:735-743.
12. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL. 1983. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature 303:808-810.
13. Reinherz EL, Meuer SC and Schlossman SF. 1983. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunol Today 4:5-8.
14. Reinherz EL, Morimoto C, Fitzgerald KA, Hussey RE, Daley JF and Schlossman SF. 1982. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J Immunol 128:463-468.
15. De Martini RM and Parker JW. 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3:56-70.
16. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR and Schlossman SF. 1985. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. J Immunol 134:1508-1515.
17. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Brown HM and Schlossman SF. 1986. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. Eur J Immunol 16:198-204.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

18. Meuer SC, Schlossman SF and Reinherz EL. 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility regions. Proc Natl Acad Sci USA 79:4395-4399.
19. Shaw, S.1994. Leukocyte Differentiation Antigen Database [database]. Version 1.11 [5th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. Available from Stephen Shaw, National Institutes of Health, on disk; NIH ftp site (balrog.nci.nih.gov), Bethesda, MD].
20. Reinherz EL, Hussey RE, Fitzgerald K, Snow P, Terhorst C and Schlossman SF. 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. Nature 294:168-170.
21. Caligiuri M, Murray C, Buchwald D, Levine H, Cheney P, Peterson D, Komaroff AL and Ritz J. 1987. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. J Immunol. 139:3306-3313.
22. Benjamini E and Leskowitz S. Immunology: A Short Course. Second Edition. 1991. New York: Wiley-Liss, pp. 211-244.
23. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF. 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol 125:1269-1274.
24. Felsenstein D, Carney WP, Iacoviello VR and Hirsch MS. 1985. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152:198-203.
25. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL. 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun 40:472-477.
26. Goldstein G, Lifter J and Mittler R. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Fabre JW, eds. 1982. New York, NY: Academic Press, pp. 39-70.
27. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM. 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood 74:2203-2211.
28. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, Van Leeuwen E, Capel PJA and Haanen C. 1989. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WTI-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood 74:1152-1158.
29. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB. 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47:465-471.
30. Fauci AS. 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239:617-622.
31. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV. 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2:114-124.
32. Beverley PCL and Callard RE. 1981. Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cells antibody. Eur J Immunol 11:329-334.
33. Reinherz EL, Kung, PC, Goldstein G and Schlossman SF.1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J Immunol 123:1312-1317.
34. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Edition (H3). Clinical and Laboratory Standards Institute.
35. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA. 1990. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 11:453-459.
36. Gebel HM, Lebeck LL, Jensik SC, Landay AL and Bray RA. 1989. Discordant expression of CD3 and T-cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated with OKT3. Transplantation Proceedings 1:1745-1746.
37. Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissensen GW, Karjalainen K and De Le Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In Leukocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H and Kr. von dem Borne AEG, eds. 1989. Oxford: Oxford University Press, pp. 295-296.
38. Schroeder TI and Chatenoud L: Immunological monitoring during treatment with OKT3. Presented under the auspices of the American Society of Transplant Surgeons.
39. Koepke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5
REF 6607053 – 50 тестов (0,5 mL)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Версия JE, 06/2016

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- Обновленный адрес представительства в ЕС
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Версия JF, 10/2018

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CYTO-STAT triCHROME MsIgG1-FITC/ MsIgG1-RD1/ MsIgG1-PC5

REF 6607054 – 50 тестов

Ч.№ 4238052-FF

CE BECKMAN COULTER

	MsIgG1-FITC	MsIgG1-RD1	MsIgG1-PC5
Специфичность	Не применимо	Не применимо	Не применимо
Клон	2T8-2F5	2T8-2F5	2T8-2F5
Гибридома	NS1 x BALB/c	NS1 x BALB/c	NS1 x BALB/c
Иммуноген	Не применимо	Не применимо	Не применимо
Подкласс иммуноглобулина	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Специальная среда	Специальная среда	Специальная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждается светом длиной волны 468-509 nm/светоизлучает на длине волны 504-541 nm	Возбуждается светом длиной волны 486-580 nm/светоизлучает на длине волны 568-590 nm	Возбуждается светом длиной волны 486-580 nm/светоизлучает на длине волны 660-680 nm
Конъюгат	FITC (Изотиоцианат флуоросцеина)	RD1 (Фикоэритрин)	PC5 (Фикоэритрин-Cy5)
Молярная концентрация	FITC/Белок: 3-10	RD1/Белок: 0,5-1,5	PC5/Белок: 0,5-1,5

ИЗОТИПИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME MsIgG1-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 является трёхцветным реагентом, содержащим три мышиных моноклональных антитела. Все три антитела помечены разными флуорохромами. Этот продукт предназначен для использования в качестве реагента контроля качества для отслеживания уровня неспецифического связывания антител в процедурах мечения клеточной поверхности с использованием реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 для идентификации и подсчёта CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/CD4+ и CD3+/CD8+ лимфоцитов при проточной цитометрии цельной крови.

За инструкциями по использованию этого реагента обратитесь к вкладышу в упаковку реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ

Антитела MsIgG1 используются для контроля неспецифического связывания в процедурах мечения клеток с использованием мышиных антител подкласса IgG1, конъюгированных с FITC, RD1 и PC5.[1-3]

РЕАГЕНТ

Смотрите таблицу выше.

СОСТАВ РЕАГЕНТА

Кроме антител, в состав реагента входят 0,2% БСА, 0,01 М фосфата калия, 0,15 М NaCl, 0,1% NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодоацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

1. Этот реагент содержит 0,1% азида натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. Во время утилизации соединения азида следует смывать проточной водой. Рекомендуется соблюдение этих предосторожностей для избежания образования отложений в металлических трубах, что может создавать взрывоопасные условия. При попадании в глаза или на кожу, тщательно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми материалами, с ними соприкасающимися, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
3. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта проб с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не используйте реагент после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.
5. Минимизируйте воздействие света на реагент при хранении или инкубации.
6. Избегайте бактериального загрязнения реагентов, так как оно может привести к ошибочным результатам.
7. Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этим реагентом.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Открытый реагент сохраняет стабильность в течение 90 дней после вскрытия при хранении при температуре 2-8°C. Сразу после использования верните реагент к 2-8°C. Не замораживайте. Минимизируйте воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любое внешнее изменение реагента (в норме это прозрачная розовая жидкость) или значительные колебания значений контрольных показателей могут указывать на разрушение реагента, и в таком случае его не следует использовать.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Реагент CYTO-STAT triCHROME используется прямо из флакона.

ПРИМЕНЕНИЕ

Данный реагент предназначен для использования со стандартными методами проточной цитометрии. Они используют селекцию лимфоцитов включая в расчёты боковое рассеяние (SS) и рассеяние вперёд (FS) (см. Рисунок 1). За инструкциями по использованию этого реагента обратитесь к вкладышу в упаковку реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/ CD3-PC5.

ИЗБРАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. ASHI Standards For Clinical Flow Cytometry and Cell Surface Phenotyping Laboratories. 1987. ASHI Quarterly 11 (1).
2. National Committee For Clinical Laboratory Standards: Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood lymphocytes; Tentative Guideline. 1992. NCCLS Document H42-T, pp. 12, 13, 37, 38.
3. Flow Cytometry Inspection Checklist. Fall 1988. College of American Pathologists, Commission on Laboratory Accreditation, p. 9.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

CYTO-STAT triCHROME
MsIgG1-FITC/MsIgG1-RD1/MsIgG1-PC5
REF 6607054 - 50 тестов (0,5 mL)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Версия FD, 02/2016
Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Версия FE, 06/2016
Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- Обновленный адрес представительства в ЕС
- ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Версия FF, 10/2018
Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

REF 6607013 — 50 тестов

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

REF 6607073 — 50 тестов

Номер по каталогу B90108-AD

CE BECKMAN COULTER

	CD45-FITC	CD4-RD1	CD8-ECD	CD3-PC5	CD56-RD1	CD19-ECD
Специфичность	CD45	CD4	CD8	CD3	CD56	CD19
Клон	B3821F4A	SFCI12T4D11	SFCI21Thy2D3	UCHT1	N901/NKH-1	J3-119
Гибридома	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c	NS-1 x BALB/c
Иммуноген	Трансфектант, содержащий кДНК человеческого CD45	Человеческие периферийные Т-лимфоциты	Человеческие тимоциты	Человеческие тимоциты и лимфоциты периферической крови от пациента с лейкемией Сезари	Человеческие клетки хронической миелоидной лейкемии	Клетки лимфомы SKLY 18
Цепь Ig	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Виды	Мышь	Мышь	Мышь	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость	Кондиционированная среда	Кондиционированная среда	Кондиционированная среда	Асцитическая жидкость	Кондиционированная среда
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуоресценция	Возбуждение при 468–509 нм Излучение при 504–541 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 568–590 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 610–635 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 660–680 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 568–590 нм	Возбуждение при 486–580 нм Излучение при 610–635 нм
Конъюгация	FITC (флуоресцеин изотиоцианат)	RD1 (фикоэритрин)	ECD (фикоэритрин-Texas Red-X)	PC5 (фикоэритрин-Cy5)	RD1 (фикоэритрин)	ECD (фикоэритрин-Texas Red-X)
Молярное отношение	FITC/белок: 3–10	RD1/белок: 0,5–1,5	ECD/белок: 0,5–1,5	PC5/белок: 0,5–1,5	RD1/белок: 0,5–1,5	ECD/белок: 0,5–1,5

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/ CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/ CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 предназначены для использования в проточных цитометрах Cytomics FC 500, Navios и Navios EX. Реагенты также используются с системой tetraCXP для системы проточной цитометрии FC 500, программным обеспечением Navios tetra для системы Navios и программным обеспечением Navios EX tetra для системы Navios EX.

Эти реагенты, отдельно или в сочетании с автоматизированными системами, предназначены для диагностики in vitro и позволяют одновременно определить и подсчитать методом проточной цитометрии в цельной крови общее содержание CD3+, общее содержание CD4+, общее содержание CD8+, двойные CD3+CD4+, двойные CD3+CD8+ и/или общее содержание CD3+, CD19+ и CD3–CD56+, процентное содержание лимфоцитов и абсолютные значения.[1,2,3] Эти системы также вычисляют отношение CD4/CD8 при использовании CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/ CD3-PC5. Эти реактивы предназначены для использования в иммунологическом обследовании пациентов, у которых присутствует иммунодефицит или подозрение на иммунодефицит.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Популяция лимфоцитов периферической крови человека состоит из клеток трех типов: Т-клеток (происходят из тимуса), В-клеток (происходят из костного мозга) и NK-клеток (натуральные киллеры).[4] Эти типы клеток нельзя разделить морфологически при помощи микроскопии, но можно различить по характерным антигенным детерминантам на поверхности их клеточных мембран.

Т-, В- и NK-лимфоциты играют центральную роль в функционировании иммунной системы. Различные подтипы Т-лимфоцитов способны распознавать конкретные антигены, выполнять функции эффекторных клеток, управлять типом и интенсивностью клеточного и/или гуморального иммунного ответов. После активации антигенами или макрофагами посредством Т-лимфоцитов особые В-лимфоциты начинают дифференцироваться в плазматические клетки, производящие и выделяющие специфические иммуноглобулины (Ig). NK-лимфоциты были идентифицированы как отдельная популяция цитолитических эффекторных клеток, которые, по-видимому, играют ключевую роль в регуляции гематопоэза, в защите от инфекций и в разрушении клеток злокачественных опухолей. Цитолитическая активность NK-лимфоцитов не контролируется антигенами классов I и II главного комплекса гистосовместимости (MHC).[4]

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Лимфоциты CD3+, CD4+, CD8+ и (или) CD19+

Процентную долю и абсолютные количества лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+ можно использовать для оценки состояния иммунной системы и его значения для известных или неизвестных заболеваний, а также для мониторинга уровней этих клеток при трансплантации органов.[17,25,26,27,28,29,30,31,32,33]

Например, идентификация аномального уровня лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+ может помочь при диагностике и/или определении прогноза неидентифицированных болезненных состояний с низким числом лейкоцитов. Изменение процентной доли лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+ и/или CD19+ после трансплантации органов (почки, сердца, печени, легкого) свидетельствует о том, что измерение числа Т-лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+) и/или В-лимфоцитов (CD19+) может быть полезно при мониторинге данных клеточных популяций.

Выявление аномально низкого уровня клеток CD4+ (иммунодефицита) и соответствующих соотношений CD4+/CD8+ также может помочь в постановке диагноза и/или определении прогноза заболеваний, связанных с иммунной недостаточностью. Например, инфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который является этиологическим агентом синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), приводит к выраженной иммунноdепрессии, в первую очередь, из-за селективного падения уровня CD4+ лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к этому вирусу.[17,34]Прогрессирующее клиническое и иммунологическое истощение, как правило, коррелирует с уменьшением числа лимфоцитов CD4+.[17]

Лимфоциты CD3–CD56+

Популяции NK-лимфоцитов функционально определяются как популяции лимфоцитов, способные проявлять против мишеней, таких как опухолевые и инфицированные вирусами клетки, цитотоксичность, не связанную с MHC.[35]

Соотношение CD4/CD8

Связанные с заболеваниями изменения в уровнях лимфоцитов CD4+ и CD8+ могут повлиять на соотношение CD4/CD8 (клетки-индукторы: клетки-супрессоры/цитотоксические). В связи с этим, соотношение CD4/CD8 может быть полезным индикатором состояния иммунной системы при диагностике и определении прогноза заболеваний.

Соотношение CD4/CD8 в сочетании с количеством лимфоцитов CD4+ широко используется для лабораторной оценки СПИД-ассоциированного комплекса и СПИДа.[17,36] Соотношение CD4/CD8 у пациентов с прогрессирующим СПИДом приближается к нулю, а лимфоциты CD4+ не определяются.[17] В таких случаях уровень лимфоцитов CD8+ может быть нормальным, повышенным или пониженным. Пониженная процентная доля лимфоцитов CD4+ и CD8+ без существенных изменений соотношения CD4/CD8 наблюдалась у пациентов со стабильным функционированием почечного аллотрансплантата.[5] Кроме того, пониженное соотношение CD4/CD8 и низкая процентная доля лимфоцитов CD4+ зафиксирована у пациентов в ходе фенотипической перестройки после трансплантации очищенного аутологичного костного мозга.[31,32]

Панель Lymphocyte Immunophenotyping (иммунофенотипирование лимфоцитов)

Реагент CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/ CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 позволяет выполнить подсчет основных популяций лимфоцитов пациента: клеток Т, В и NK. Данный реагент может служить средством контроля качества (LymphoSum) для оценки выхода лимфоцитов по селектору CD45/SS

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(соответствует всем субпопуляциям лимфоцитов). Общий процент лимфоцитов может быть определен по следующей формуле:

Суммарный процент лимфоцитов (%) = %CD3+(T) + %CD19+(B) + %CD3–CD56+(NK).[47,48]

При использовании в качестве панели, реагенты CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 также функционируют как средство контроля качества образца по общему проценту лимфоцитов и измерения количества CD3+ лимфоцитов в панели (интрапанельная проверка CD3+).[48]

ПРИНЦИПЫ ТЕСТА

Этот тест основан на способности моноклональных антител связываться с поверхностью клеток, экспрессирующих отдельные антигенные детерминанты. Специфическое окрашивание клеток осуществляется путем инкубации цельной крови с реагентом, содержащим моноклональные антитела. Реагенты с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 являются комбинацией четырех типов мышиных моноклональных антител, каждое из которых конъюгировано с конкретным флуорохромом и специфично к определенным поверхностным клеточным антигенам.

Эритроциты лизируются с помощью системы реагентов COULTER IMMUNOPREP на рабочей станции TQ-Prep. Оставшиеся белые кровяные тельца анализируются путем проточной цитометрии с использованием селекторов лимфоцитов. На первой гистограмме для каждого из реактивов селектор лимфоцитов определяется как имеющий яркую флуоресценцию CD45+ FITC и низкое боковое рассеяние (SS).

Для CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/CD3–PC5 следующие гистограммы/графики используются для определения процента положительно окрашенных клеток: CD3+ (только положительная PC5 флуоресценция), CD3+CD4+ (положительная PC5/RD1 флуоресценция), CD3+CD8+ (положительная PC5/ECD флуоресценция).
Для CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/ CD19-ECD/CD3–PC5 следующие гистограммы/графики используются для определения процента положительно окрашенных клеток: CD3+ (только положительная PC5 флуоресценция), CD3–CD56+ (только положительная RD1 флуоресценция), CD3-CD19+ (только положительная ECD флуоресценция).

Программное обеспечение tetraCXP, Navios tetra или Navios EX tetra в сочетании с реагентами с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/ CD3-PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/ CD56RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 позволяет выполнять автоматизированный анализ субпопуляций лимфоцитов. (Использование этих реагентов с указанными системами и их соответствующие рабочие характеристики приведены в tetraCXP SYSTEM Guide (Руководство по эксплуатации системы tetraCXP), Navios tetra Software System Guide (Руководство по системе программного обеспечения Navios tetra) или Navios EX tetra Software System Guide (Руководство по системе программного обеспечения Navios EX tetra).)

РЕАГЕНТЫ

Смотрите таблицу на странице 1.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

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

Концентрация реагентов, не являющихся антителами, составляет: 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 0,01 M фосфата калия, 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3 и стабилизаторы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Йодацетамид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

1. Эти реагенты содержат 0,1% азида натрия. В кислой среде из азида натрия образуется азотистоводородная кислота, крайне токсичное соединение. При утилизации азидные соединения должны смываться проточной водой. Для избежания отложения материалов в металлических трубах, в результате чего может возникать угроза взрыва, рекомендуется соблюдать эту меру предосторожности. При попадании в глаза или на кожу тщательно промойте водой.
2. С образцами, пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
3. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу и слизистые оболочки.
4. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. При хранении или инкубации сводите к минимуму воздействие света на реагенты.
6. Избегайте микробного загрязнения реагента, в противном случае возможно получение ошибочных результатов.
7. При работе с реагентом следуйте принципам надлежащей лабораторной практики (GLP).
8. Проверьте все графики данных и гистограммы до составления отчета о результатах. Обратитесь к разделу «Сбор данных методом проточной цитометрии / Процедура анализа».
9. При получении данных без применения автоматического анализа и с использованием системы проточной цитометрии FC 500 с программным обеспечением CXP убедитесь, что для всех отображаемых точечных диаграмм параметр «Events» (События) установлен на 100%.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент стабилен до истечения срока годности при хранении при температуре 2–8°C. Открытые флаконы стабильны 90 дней при хранении при температуре 2–8°C. Доведите реагент до температуры 2-8°C сразу после использования. Не замораживать. Минимизируйте воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств данного реагента (обычно это прозрачная розовая жидкость) или любые серьезные отклонения в показаниях, полученных для контрольных проб, могут свидетельствовать о разрушении; в этом случае реагент использовать нельзя.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Эти реагенты с моноклональными антителами CYTO-STAT используются прямо из флакона. Доведите реагент до температуры 20–25°C перед использованием.

СБОР ОБРАЗЦОВ

- Для каждого анализа проточной цитометрии требуется 100 µL цельной крови.
- Оптимальное окрашивание достигается при количестве лейкоцитов в пределах 3-10 x 10^3 клеток/µL.
- При количестве лейкоцитов более 10 x 10^3 клеток/µL может потребоваться разбавление.
- При количестве лейкоцитов ниже 3 x 10^3 клеток/µL может потребоваться провести центрифугирование и повторное получение суспензии с аутологической плазмой.
- Для получения подробной информации о сборе цельной крови путем венепункции и условиях, мешающих процедуре, см. раздел «Процедура сбора диагностических образцов крови путем венепункции».[38]

1. Возьмите образец венозной крови путем венепункции в пробирку для сбора крови в стерильных условиях с использованием рекомендованного антикоагулянта (ЭДТА).
2. Подсчитайте общее количество белых кровяных телец, используя установленную процедуру.
3. Образцы с количеством лейкоцитов вне пределов нормального диапазона 3–10 x 10^3 клеток/µL могут потребовать разведения или концентрации.

ПРОЦЕДУРА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ РЕАГЕНТА CYTO-STAT С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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

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

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Система реагентов COULTER IMMUNOPREP для рабочей станции COULTER TQ-Prep, номер по каталогу 7546999 — 300 тестов

Разбавитель (если требуется) аутологическая плазма

Набор реагентов CYTO-COMP, номер по каталогу 6607021 (4 x 0,5 mL)

ИЛИ

Набор QuickCOMP 4, номер по каталогу 177017

Набор клеток CYTO-COMP, номер по каталогу 6607023 (5 x 1 mL)

ИЛИ

IMMUNO-TROL Control Cells, номер по каталогу 6607077

ИЛИ

IMMUNO-TROL Low Cells, номер по каталогу 6607098

Калибровочные частицы Flow-Count, номер по каталогу 7547053 (20 mL)
(дополнительно поставляемый реагент для технологии единой платформы (SPT) или для абсолютных подсчетов SPT)

Пробирки 12 x 75 мм

Пробирки для сбора крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Переносящие пипетки

Пипетка Пастера

Микропипетки

Вращательная мешалка

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проточный цитометр

Счетчик клеток или гемацитометр

Комплект фильтров для одномодового лазера, только для проточного цитометра Cytomics FC 500, номер по каталогу 179044

ИЛИ

Узел модуля фильтров для одномодового лазера, только для проточного цитометра Cytomics FC 500, номер по каталогу 179045

Аппликаторы с ватными наконечниками

ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦА

ПРИМЕЧАНИЕ. При использовании автоматического пипетирующего устройства убедитесь, что в следующей процедуре используются объемы образца и реагента.

1. Для каждой пробы необходимо пометить две пробирки 12 x 75 мм, по одной для каждого реагента с моноклональными антителами из панели на две пробирки.
2. Добавьте 10 µL CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 или CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56-RD1/ CD19–ECD/CD3–PC5 в соответствующую помеченную тестовую пробирку.
3. Добавьте 100 µL образца венозной крови в каждую тестовую пробирку. Соблюдайте осторожность, чтобы избежать попадания крови на верхнюю и боковые части пробирок; в противном случае лизис может быть неполным.
4. Осторожно перемешайте на вортексе. Инкубируйте реактивные смеси при 20-25°C в течение 10-12 минут.

ВАЖНО! Если капли крови остаются вокруг верхней части или на стенках тестовой пробирки, их необходимо удалить, так как в противном случае нелизированные эритроциты могут контаминировать конечную пробу и исказить результаты. Для удаления капель можно использовать ватную палочку.

5. Выполните лизирование эритроцитов в каждой тестовой пробирке, используя систему реагентов COULTER IMMUNOPREP.

ПРИМЕЧАНИЕ. В случае использования флуоросфер Flow-Count перемешайте на вортексе флакон флуоросфер Flow-Count и добавьте по 100 µL в каждую тестовую пробирку.

6. Проанализируйте клетки на или проточных цитометрах Cytomics FC 500, Navios или Navios EX. Следуйте процедуре «Сбор данных методом проточной цитометрии / процедуре анализа» приведенной ниже.

ПРИМЕЧАНИЕ. В случае использования флуоросфер Flow-Count, приготовленные пробы необходимо проанализировать в течение 2 часов после добавления флуоросфер Flow-Count в каждую пробирку.

a. Значения флуоресценции проточной цитометрии необходимо регистрировать на логарифмической шкале.
b. Прямое рассеяние (FS) и боковое рассеяние (SS) необходимо регистрировать на линейной шкале.

АБСОЛЮТНЫЙ ПОДСЧЕТ

Абсолютный подсчет можно проводить двумя методами. Метод двойной платформы (также известный как стандартный (непрямой) метод) вычисляет абсолютные значения, комбинируя результаты гематологического исследования и проточной цитометрии, и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/µL) =
Общее количество лейкоцитов (клеток/µL) x
% лимфоцитов x % положительно-окрашенных клеток ÷ 10^4

Метод единой платформы Flow-Count (также известный как прямой метод, или SPT) использует флуоросферы Flow-Count для непосредственного определения абсолютных значений и использует следующую формулу:

Абсолютное количество (клеток/µL) =
(Общее количество подсчитанных интересуемых к леток ÷
Общее количество подсчитанных флуоросфер Flow-Count) x Измеренная концентрация флуоросфер Flow-Count

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для значения рассеяния света и интенсивности флуоресценции в соответствии с рекомендациями изготовителя (см. Instrument Manuals (Руководства по эксплуатации приборов)).
2. Флуорохромы флуоресцеин изотиацианат (FITC), фикоэритрин (RD1), фикоэритрин-Texas Red-X (ECD) и фикоэритрин-Cy5 (PC5) излучают свет на разных длинах волн, но при этом возникает наложение спектров, которое нужно корректировать методом электронной компенсации.
   a. Оптимальные уровни полной матричной компенсации на проточных цитометрах FC 500, Navios и Navios EX могут быть установлены с помощью отдельного анализа клеток CYTO-COMP, окрашенных с набором QuickCOMP 4 при использовании применимой программы AutoSetup.
3. Перед началом анализа проб измеряемый контроль (например, клетки IMMUNO-TROL Cells или низкочисленные клетки IMMUNO-TROL Low Cells) следует окрасить для проверки компенсации и реакционной способности антител.
4. Специфическое и/или неспецифическое Fc связывание антител с моноцитами и гранулоцитами, имеющимися в пробе, можно исключить путем надлежащей селекции лимфоцитов в проточном цитометре.[39] Лимфоциты идентифицируются на основе яркой флуоресценции CD45+ и низкого бокового рассеяния.[40]
5. Отрицательно окрашенные популяции можно использовать для установки курсора.[37]

СБОР ДАННЫХ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ / ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

ОСТОРОЖНО! Если лазер проточного цитометра смещен, установлены неправильные фильтры или если селекторы были установлены неправильно, результаты могут оказаться ошибочными.

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

Протокол селекции вручную:

1. Выберите параметры: FS Lin, SS Lin, FL1 Log, FL2 Log, FL3 Log и FL4 Log.
2. Создайте следующие графики:
   - Зависимость FL1 Log (CD45) от SS Lin
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FL2 Log (CD4)
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FL3 Log (CD8)
   - Гистограмма FL4 Log (CD3)
   - Зависимость FL3 Log (CD8) от FL2 Log (CD4)
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FS (дополнительно для абсолютных значений технологии единой платформы (SPT))
3. Создайте области и селекторы:
   a. Создайте область A в скоплении лимфоцитов, которое появится на графике FL1/SS (см. Рисунок 1a).
   b. Определите селектор A на графиках зависимости FL4 от FL2, FL4 от FL3 и гистограмме FL4 (см. Рисунок 1b-1d).
   c. Создайте квадрантные области на графиках зависимости FL4 от FL2 и FL4 от FL3 (см. Рисунок 1b и 1c).
   d. Создайте линейную область D на гистограмме FL4 (см. Рисунок 1d).
   e. Определите селектор D на графике зависимости FL3 от FL2 (см. Рисунок 1e).
   f. Создайте квадрантную область на графике зависимости FL2 от FL3 (см. Рисунок 1e).
4. Дополнительно для абсолютных значений технологии единой платформы (SPT):
   a. Создайте прямоугольную область под названием «CAL» на графике зависимости FL4 от FS (см. Рисунок 1f).
5. Проверьте следующие настройки:
   - Гистограмма остановки подсчета = 6 000 событий лимфоцитов, прошедших селекцию (гистограмма FL4)
   - Скорость потока = высокая
   - Максимальное количество событий = 100 000
   - Время остановки = 300 секунд
   - Дискриминатор = FS линейный = 100
   - Требуемая статистика выбрана (клеток/µL, количество, % прошедших селекцию)
6. Сохранить протокол (например, tetraCHROME 45-4-8-3.pro).

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

Протокол селекции вручную:

1. Выберите параметры: FS Lin, SS Lin, FL1 Log, FL2 Log, FL3 Log и FL4 Log.
2. Создайте следующие графики:
   - Зависимость FL1 Log (CD45) от SS Lin
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FL2 Log (CD56)
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FL3 Log (CD19)
   - Гистограмма FL4 Log (CD3)
   - Зависимость FL4 Log (CD3) от FS (дополнительно для абсолютных значений технологии единой платформы (SPT))
3. Создайте области и селекторы:
   a. Создайте область A в скоплении лимфоцитов, которое появится на графике FL1/SS (см. Рисунок 2a).
   b. Определите селектор A на графиках зависимости FL4 от FL2, FL4 от FL3 и гистограмме FL4 (см. Рисунок 2b-2d).
   c. Создайте квадрантные области на графиках зависимости FL4 от FL2 и FL4 от FL3 (см. Рисунок 2b и 2c).
   d. Создайте линейную область D на гистограмме FL4 (см. Рисунок 2d).
4. Дополнительно для абсолютных значений технологии единой платформы (SPT):
   a. Создайте прямоугольную область под названием «CAL» на графике зависимости FL4 от FS (см. Рисунок 2e).
5. Проверьте следующие настройки:
   - Гистограмма остановки подсчета = 10 000 событий лимфоцитов, прошедших селекцию (гистограмма FL4)
   - Скорость потока = высокая
   - Максимальное количество событий = 100 000
   - Время остановки = 300 секунд
   - Дискриминатор = FS линейный = 100

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Требуемая статистика выбрана (клеток/µL, количество, % прошедших селекцию)

6. Сохранить протокол (например, tetraCHROME 45-56-19-3.pro).

ПРИМЕЧАНИЕ. Обратитесь к соответствующим Инструкциям по использованию прибора для получения дополнительных инструкций по созданию протоколов. Например, для добавления статистики, FlowPAGES, отметки дополнительного параметра и настройки, показывающие % в области.

Процедура анализа:

1. Прогон подготовленной пробы CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/ CD3-PC5.
   a. Постройте двухпараметрическую гистограмму зависимости CD45-FITC (FL1 Log) от SS Lin (графики). Может быть заметен трехчастный дифференциал. Измените селектор (**A**), чтобы в него входили лимфоциты с яркой флуоресценцией CD45+ FITC и низким SS (см. Рисунок 1a). В данном анализе приоритет отдается включению всех лимфоцитов, в то время как моноциты (с экспрессией меньше CD45 и промежуточным SS) и базофилы (с экспрессией меньше CD45 и низким SS) должны быть максимально исключены.
   b. Установите границы области на двухпараметрических гистограммах (графиках), чтобы сгруппировать двойные негативные популяции (CD3–CD4– и CD3–CD8–) и вплотную обвести популяции CD3+CD4– и CD3+CD8–, как показано на Рисунках 1b и 1c. Установите границу области на гистограмме общего количества CD3+, чтобы произвольно обвести популяцию CD3+, как показано на Рисунке 1d.

ПРИМЕЧАНИЕ. Гранулоциты (GR), базофилы (BA), моноциты (MO) и области органических остатков, как показано на Рисунке 1a.

2. Выполните прогон подготовленной пробы CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/ CD19-ECD/CD3-PC5.
   a. Постройте двухпараметрическую гистограмму зависимости CD45-FITC (FL1 LOG) от SS Lin (графики). Может быть заметен трехчастный дифференциал. Измените селектор (**A**), чтобы в него входили лимфоциты с яркой флуоресценцией CD45+ FITC и низким SS (см. Рисунок 2a). В данном анализе приоритет отдается включению всех лимфоцитов, в то время как моноциты (с экспрессией меньше CD45 и промежуточным SS) и базофилы (с экспрессией меньше CD45 и низким SS) должны быть максимально исключены.

ПРИМЕЧАНИЕ. Гранулоциты (GR), базофилы (BA), моноциты (MO) и области органических остатков, как показано на Рисунке 2a.

   b. Установите границы области на двухпараметрических гистограммах (графиках), чтобы сгруппировать двойные негативные популяции (CD3–CD19– и CD3–CD56–) и вплотную обвести популяции CD3+CD19– и CD3+CD56, как показано на Рисунках 2b и 2c. Установите границу области на гистограмме общего количества CD3+, чтобы произвольно обвести популяцию CD3+, как показано на Рисунке 2d.

3. В таблице ниже указаны квадранты / области и гистограммы, используемые для подсчета каждой популяции:

Популяция	**Квадрант / Область**	**Рисунок гистограммы №**
Общее количество CD3+	CD3+	Маски 1d и 2d
CD3+CD4+	2	1b
CD3+CD8+	2	1c
CD19+	1	2c
CD3–CD56+	1	2b

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

На рисунках с 1a по 1f представлены данные, полученные после анализа нормальной цельной крови, обработанной реагентами tetraCHROME CD45/CD4/CD8/CD3.

Рисунок 1a. Точечная диаграмма зависимости CD45-FITC (FL1 Log) от бокового рассеяния для определения лимфоцитов (селектор A), гранулоцитов (GR), базофилов (BA), моноцитов (MO) и органических остатков.

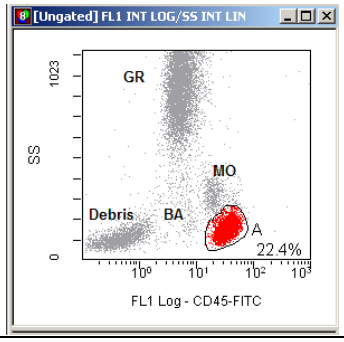


Рисунок 1b. Точечная диаграмма зависимости CD3-PC5 (FL4 Log) от CD4-RD1 (FL2 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

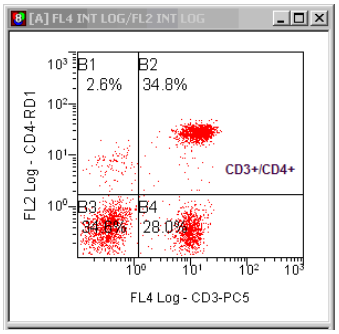


Рисунок 1c. Точечная диаграмма зависимости CD3-PC5 (FL4 Log) от CD8-ECD (FL3 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

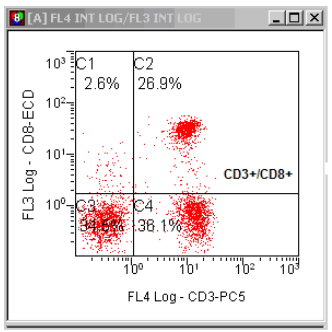


Рисунок 1d. Гистограмма CD3-PC5 (FL4 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

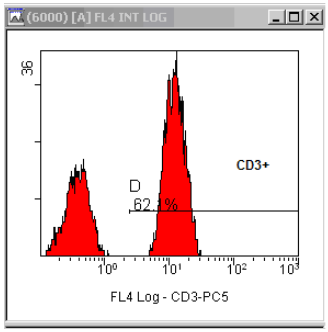


Рисунок 1e. Точечная диаграмма зависимости CD8-ECD (FL3 Log) от CD4-RD1 (FL2 Log) с селектором CD3+ лимфоцитов (селектор A+D).

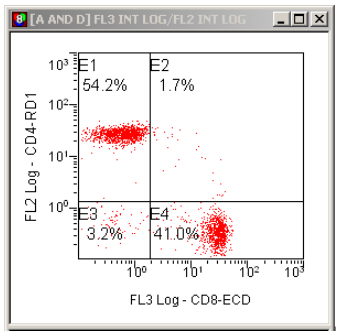
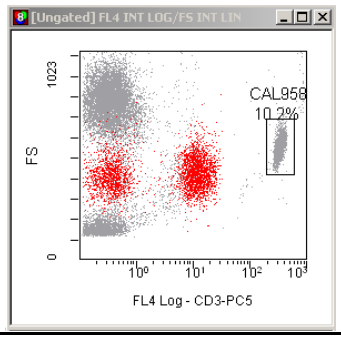


Рисунок 1f. Дополнительный график для абсолютных значений технологии единой платформы: Точечная диаграмма зависимости негейтированного FL4 Log от FS с областью «CAL».



На рисунках с 2a по 2e представлены данные, полученные после анализа нормальной цельной крови, обработанной реагентами tetraCHROME CD45/CD56/CD19/CD3.

Рисунок 2a. Точечная диаграмма зависимости CD45-FITC (FL1 Log) от бокового рассеяния для определения лимфоцитов (селектор A), гранулоцитов (GR), базофилов (BA), моноцитов (MO) и органических остатков.

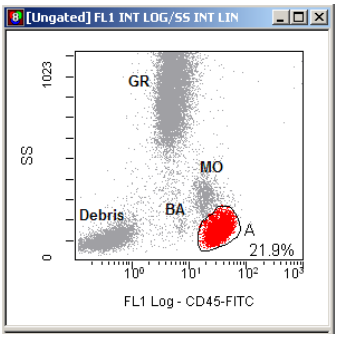


Рисунок 2b. Точечная диаграмма зависимости CD3-PC5 (FL4 Log) от CD56-RD1 (FL2 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

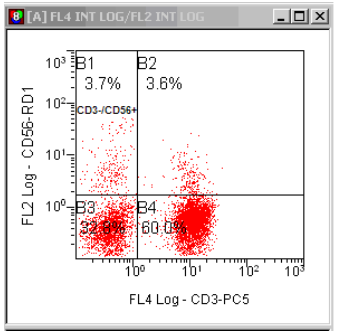


Рисунок 2c. Точечная диаграмма зависимости CD3-PC5 (FL4 Log) от CD19-ECD (FL3 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

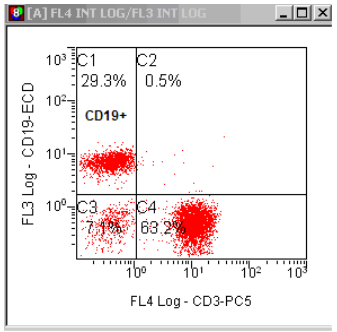


Рисунок 2d. Гистограмма CD3-PC5 (FL4 Log) с селектором лимфоцитов (селектор A).

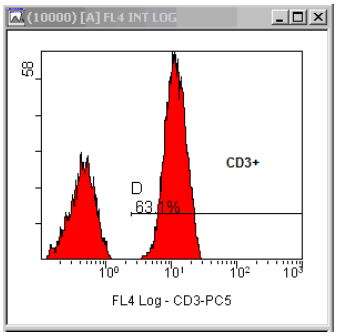
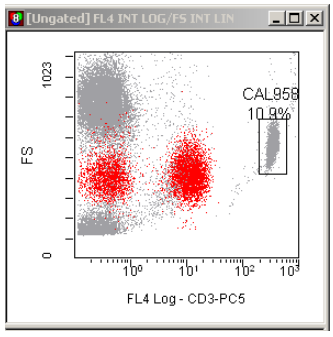


Рисунок 2e. Дополнительный график для абсолютных значений технологии единой платформы: Точечная диаграмма зависимости FL4 Log без селектора от FS с областью «CAL».



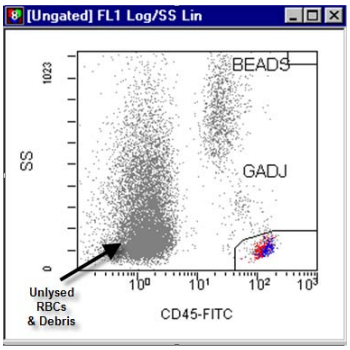
АНАЛИТИЧЕСКАЯ ПРОВЕРКА НАДЕЖНОСТИ СЕЛЕКЦИИ ВРУЧНУЮ

ВАЖНО! Существует риск сообщения ошибочных результатов. Для правильной интерпретации данных по рассеянию света, окрашиванию антителами с учетом всех селекторов и ограничений, используемых для тестирования, их должен просматривать специалист по лабораторной диагностике. Если результаты кажутся подозрительными, следуйте лабораторным процедурам.

Просмотр данных должен включать следующие этапы:

1. Просмотрите данные по рассеянию света.
   a. Убедиться в том, что интересуемая популяция(-и) находится выше дискриминатора и не произошла потеря клеток.
   b. Убедиться в том, что интересуемая популяция(-и) максимально разделена от других присутствующих популяций (в пределах биологических ограничений).
2. Просмотрите структуры окрашивания антителами.
   a. Убедиться в том, что в целом наблюдаются ожидаемые шаблоны окраски (флуоресцентное окрашивание коррелирует с антителом, используемым в образце препарата).
   b. Чрезмерно тусклое или отрицательное окрашивание пробы должно быть проверено на соответствие с клинической картиной и другими данными.
3. Просмотрите границы селектора и области.
   a. Селекторы и области должны обводить интересующие популяции и исключать нежелательные события.
   b. Не все эритроциты могут лизироваться в следующих условиях: ядросодержащие эритроциты, патологическая концентрация белка, гемоглобинопатия. Следует использовать CD45 в качестве условия селекции лимфоцитов, поскольку эритроциты, будучи CD45-негативными, не будут включены в лимфоцитарный селектор (см. Рисунок 3).[40]

Рисунок 3. Образец неполного лизирования эритроцитов



Для подтверждения точности селекции вручную необходимо проверить результаты селекции вручную на соответствие следующим критериям.

1. Для результатов окрашивания tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5:
   T-Sum:
   a. Данная проверка надежности известна, как проверка надежности по CD3+.
   b. В идеале сумма процентов CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток должна равняться общему проценту CD3+ клеток ±5%.
   c. В образцах, содержащих значительное количество гамма/дельта Т-лимфоцитов и (или) CD4/CD8 позитивных Т-лимфоцитов, результат данной проверки достоверности может превысить максимальное значение вариабельности.[37,47,48,49] В подобных случаях ошибки T-Sum вызываются биологическими свойствами образца, а не вариабельностью метода селекции вручную, и такие результаты могут быть приемлемыми.
   d. Для получения информации о действиях, которые необходимо предпринять, если критерий приемлемости для анализов превысил ± 5% и если образцы не содержат значительное число дважды отрицательных клеток и (или) дважды положительных CD4+CD8+ Т-клеток, см. этап 4.
   e. См. раздел ОГРАНИЧЕНИЯ 19 для получения дополнительной информации по критериям приемлемости T-Sum.
2. Для результатов окрашивания tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5:
   LymphoSum:
   a. Общий процент лимфоцитов может быть определен по следующей формуле: Суммарный процент лимфоцитов (%) = %CD3+(T) + %CD19+(B) + %CD3–CD56+(NK).[47,48]
   b. В идеале LymphoSum должен быть >95%. Для получения информации о действиях, которые необходимо предпринять, если LymphoSum <90%, см. этап 4.
3. Для результатов окрашивания tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CD45–FITC/CD56–RD1/ CD19–ECD/CD3–PC5:
   Интрапанельная проверка CD3+:
   a. При интрапанельной проверке CD3+ внутренним контролем служит вариабельность CD3 между пробирками.[48]
   b. Различия при воспроизведении результатов анализа CD3 между пробирками должны быть ±3,5%.
   c. Для получения информации о действиях, которые необходимо предпринять в отношении анализа при превышении критериев приемлемости ±3,5%, см. этап 4.
4. Результаты, превышающие критерии приемлемости, должны быть проверены на правильное расположение селектора и области. Если проблема не решается таким образом, необходимо провести повторный анализ проб и (или) приготовить и проанализировать новые пробы.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Образцы должны быть приготовлены с использованием реагентов CYTO-STAT tetraCHROME и системы реагентов IMMUNOPREP в течение 24 часов после сбора.
2. Если анализ методом проточной цитометрии будет выполнен в течение 2 часов, то подготовленные пробы можно хранить при комнатной температуре в защищенном от света месте. В противном случае закройте пробу и храните ее в темном месте при 2–8 . Пробу нужно проанализировать в течение 24 часов после приготовления.
3. Для подсчета абсолютного количества клеток методом Flow-Count [Технология единой платформы] пробы необходимо проанализировать в течение 2 часов после добавления флуоросфер Flow-Count.
4. Для подсчета абсолютного количества клеток методом двойной платформы гематологический анализ должен быть проведен согласно маркировке на соответствующем гематологическом анализаторе. Удостоверьтесь, что выполняются ограничения по возрасту и обработке указанных образцов.
5. Для анализа методом проточной цитометрии с помощью tetraCXP, Navios tetra или Navios EX tetra обратитесь к соответствующим System Guides (Руководствам по системам), чтобы узнать об ограничениях по стабильности образца и приготовленной пробы.
6. Для применения реагентов tetraCHROME на проточном цитометре серии FC 500 необходимо использовать комплект фильтров для одномодового лазера (номер по каталогу 179044) или узел модуля фильтров для одномодового лазера (номер по каталогу 179045).
7. До окрашивания и анализа образцы должны оставаться в пробирках, в которых собирали кровь, их следует хранить при комнатной температуре.
8. Не помещайте образцы в холодильник. Охлажденные образцы могут дать ошибочные результаты.
9. Рекомендуемая жизнеспособность клетки для венозного образца крови составляет >90%.
10. Реагенты с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME предназначены для использования с препаратами цельной крови. Также их можно применять с клетками IMMUNO-TROL Cells и (или) низкочисленными клетками IMMUNO-TROL Low Cells. Реагенты не рекомендуется использовать со свежими и замороженными препаратами мононуклеарных клеток.
11. Не допускайте разбавления, отбора аликвот или замораживания реагентов. Используйте реагенты только из исходной упаковки.
12. Эти реагенты предназначены исключительно для проточной цитометрии.
13. У пациентов, проходивших лечение антителами к человеческим моноклональным антителам, обнаружение специфических выявляемых антигенов может быть снижено или отсутствовать вследствие частичной или полной блокировки антителами, применявшимися для лечения.[41,42,43]
14. Патологические состояния не всегда сопровождаются патологическими изменениями процентного содержания популяций лейкоцитов. У больного человека процентное соотношение лейкоцитов может быть таким же, как и у здорового. Используйте результаты анализа с учетом клинических и других диагностических данных.
15. С некоторыми пациентами могут возникать особые проблемы ввиду измененного или очень низкого числа клеток некоторых клеточных популяций.
16. У пациентов с хронической ВИЧ-инфекцией или при нарастании виремии наблюдаемое количество NK-лимфоцитов может оказаться меньше ожидаемого из-за фенотипического сдвига подгруппы NK-клеток. В таких клинических условиях происходит селективная потеря $CD56^{dim}$/CD16+ субпопуляции NK-клеток и увеличение других патологических популяций NK-клеток. Используйте результаты тестирования в сочетании с клиническими и другими диагностическими данными.[45,46]
17. Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, могут быть ошибочными, если лазер неверно отъюстирован или неправильно установлены селекторы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

18. Из-за неприемлемого разброса результатов применения разных лабораторных методов для подсчета абсолютного числа лимфоцитов необходимо проводить проверку точности используемого метода[44].
19. В некоторых образцах чистота региона лимфоцитов может быть снижена за счет загрязнения нелимфоидными элементами с низким SS и высокой флуоресценцией CD45, аналогичной таковой у популяций лимфоцитов. Данные образцы могут удовлетворять критерию приемлемости T-sum, поскольку доля CD3+CD4+ и CD3+CD8+ остается постоянной, однако результат может оказаться неверен. Рекомендуется просматривать диаграммы данных всех образцов на предмет присутствия ожидаемой структуры прокрашивания.
20. Рабочие характеристики для применения в педиатрической практике не установлены.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD45 экспрессируется на всех типах гематопоэтических клеток, за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников. Он не был выявлен в дифференцированной негематопоэтической ткани.[7,8,9,10]

Антиген CD3 обычно присутствует на клеточной поверхности зрелых тимоцитов, а также неактивированных и активированных зрелых Т-лимфоцитах периферической крови как индуцирующей, так и супрессорной/цитотоксической популяции.[12,13,14]

Антиген CD4 присутствует на тимоцитах и индуцирующей популяции Т-лимфоцитов в периферической крови.[13,14] В небольших количествах он также экспрессируется на моноцитах.[17]

Антиген CD8 обычно присутствует приблизительно на 80% тимоцитов и примерно на 30–35% Т-лимфоцитов периферической крови, а также на некоторых природных клетках-киллерах.[15,18]

Антиген CD19 экспрессируется на всех В-клетках, включая ранние клетки-предшественники В-клеток.[3] Его также можно обнаружить на фолликулярных дендритных клетках и клетках-предшественниках миеломоноцитарной линии, однако он не экспрессируется на Т-клетках, моноцитах и гранулоцитах.[1,19,20]

Антиген CD56 экспрессируется только на субпопуляции лимфоцитов, обладающих активностью натуральных киллеров (NK).[1,19,21] В результате экспрессии CD56 практически все эти клетки способны запускать в периферической крови цитотоксические реакции (не связанные с TCR).[21,22] Эта субпопуляция состоит из клеток-натуральных киллеров (CD3–CD56+) и небольшой подгруппы Т-клеток (CD3+CD56+).[1,19,23] CD56 не экспрессируется на других популяциях Т- или В-лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и эритроцитов.[23,24,25]

Об антигенной специфичности моноклональных антител CD45, CD3, CD4 и CD8, входящих в состав реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4-RD1/ CD8–ECD/CD3-PC5, уже сообщалось в материалах First International Workshop for Leukocyte Typing (Первого Международного семинара по типизации лейкоцитов) и Fifth International Workshop for Leukocyte Typing (Пятого Международного семинара по типизации лейкоцитов).[1,2]

Об антигенной специфичности моноклональных антител CD45, CD3, CD19 и CD56, входящих в состав реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/ CD19–ECD/CD3-PC5, уже сообщалось в материалах First International Workshop for Leukocyte Typing (Первого Международного семинара по типизации лейкоцитов), Fourth International Workshops for Leukocyte Typing (Четвертого Международного семинара по типизации лейкоцитов) и Fifth International Workshop for Leukocyte Typing (Пятого Международного семинара по типизации лейкоцитов).[6,11]

Для оценки клеточной перекрестной реактивности был выполнен скрининг моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD19 и CD56, входящих в состав реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/ CD8-ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/ CD19–ECD/CD3-PC5, на пробах крови здоровых взрослых людей-доноров. Результаты последовательно демонстрировали, что моноклональные антитела к CD3, CD4, CD8, CD19 и CD56 специфично реагировали с соответствующими популяциями лимфоцитов. Моноциты слабо окрашивались моноклональными антителами к CD4.

Проточные цитометры Cytomics FC 500 и EPICS XL/XL-MCL

ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

Оценка степени согласованности значений между реагентом с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/ CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56-RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 и прибором сравнения tetraONE изучалась на нормальных и патологических пробах лизированной цельной крови с помощью проточной цитометрии (проточные цитометры COULTER EPICS XL-MCL и Cytomics FC 500 с селекцией лимфоцитов). Эти данные представлены в следующей таблице и на Рисунке 4 ниже. Они подтверждают предпосылку того, что реагенты эквивалентны по своей реактивности взрослым Т- и В-лимфоцитам и NK-лимфоцитам в периферической крови. Значения выражены в процентах (%) от общего количества лимфоцитов.

% лимфоцитов CD3+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
Комбинированный tetraONE	123	47,2	92,7	76,4 ±9,5
Селекция вручную	246	47,4	92,3	76,7 ±9,2

% лимфоцитов CD3+CD4+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
tetraONE 45/4/8/3	123	1,3	72,9	30,2 ±14,8
Селекция вручную	246	1,2	74,3	30,4 ±15,0

% лимфоцитов CD3+CD8+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
tetraONE 45/4/8/3	123	12,5	80,2	43,1 ±17,1
Селекция вручную	246	12,1	80,2	43,1 ±17,2

% лимфоцитов CD19+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
tetraONE 45/56/19/3	123	1,3	33,0	12,5 ±6,5
Селекция вручную	246	0,8	32,9	12,1 ±6,5

% лимфоцитов CD3–CD56+

Метод	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
tetraONE 45/56/19/3	123	0,7	28,7	7,5 ±5,4
Селекция вручную	246	0,7	29,8	7,4 ±5,5

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

У практически здоровых мужчин и женщин были получены образцы цельной крови. Группа обследуемых включала жителей восточной части США и жителей восточной Канады различной расовой принадлежности и разного возраста (n = 24). Полученные значения не выходили за пределы ожидаемых диапазонов, ранее приведенного в tetraONE SYSTEM Guide (Руководство пользователя системы tetraONE) (n = 171).

Пробы окрашивались с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/ CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3-PC5. Значения, определенные методом проточной цитометрии (при помощи проточного цитометра COULTER EPICS XL-MCL или Cytomics FC 500 с селекцией лимфоцитов), отражают общее число клеток CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD19+ и CD3–CD56+ и приводятся в следующей таблице. Для каждой пробы было измерено количество лейкоцитов и пятичастная лейкоцитарная формула. Абсолютные значения определялись методом единой платформы Flow-Count. Полученные значения выражали в процентах (%) от общего числа лимфоцитов, а также как абсолютные значения (клеток/µL).

Эти значения приводятся исключительно как репрезентативные величины. Каждая лаборатория должна установить свой уровень ожидаемых значений, используя местную популяцию здоровых доноров.

НОРМАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЛЯ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ: CD45/CD4/CD8/CD3

% + лимфоциты	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
Общее количество CD3+	171	56	93	74,1 ±7,6
CD3+CD4+	171	29	76	48,9 ±8,5
CD3+CD8+	171	5	49	22,5 ±7,5
Абсолютное количество				
Общее количество CD3+	171	537	2 939	1 333 ±477
CD3+CD4+	171	321	2 124	878 ±334
CD3+CD8+	171	46	1 346	408 ±208

НОРМАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЛЯ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ: CD45/CD56/CD19/CD3

% + лимфоциты	n	Мин.	Макс.	Среднее ± SD
Общее количество CD3+	171	55	94	74,0 ±7,5
CD3–CD56+	171	2	26	9,3 ±4,7
CD19+	171	1	37	13,6 ±5,3
Абсолютное количество				
Общее количество CD3+	171	572	3 008	1 365 ±484
CD3–CD56+	171	13	441	164 ±90
CD19+	171	14	816	253 ±143

ЛИНЕЙНОСТЬ

Три повторных измерения производили для каждого из восьми последовательных разбавлений концентрированной пробы контрольных клеток COULTER CYTO-TROL с целью получения диапазона концентраций лимфоцитов CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3–CD56+. Клетки окрашивали с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8-ECD/ CD3–PC5 или CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/ CD3–PC5 и анализировали методом проточной цитометрии (при помощи проточных цитометров COULTER EPICS XL-MCL and Cytomics FC 500 с селектором

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лимфоцитов). См. графики ниже на Рисунке 5. Полученные значения приведены в виде абсолютных величин (клетки/µL); они были определены с помощью метода сдвоенной платформы.

ТОЧНОСТЬ

Процентная доля и абсолютное количество положительно окрашенных клеток определялись при помощи клеток IMMUNO-TROL и низкочисленных клеток IMMUNO-TROL Low Cells в два прохода дважды в день до 20 дней в трех географически удаленных центрах с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/ CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56–RD1/ CD19–ECD/ CD3–PC5. Измерения были проведены на проточном цитометре Cytomics FC 500 (% положительных и абсолютных подсчетов) для популяций CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD19+ и CD3–CD56+, и они находились в рамках результатов анализа в соответствии с листками-вкладышами в упаковке контрольного продукта.

Общее число лимфоцитов CD3+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	348	72,5 ±1,5	56,7 ±1,1
Абсолютное количество	348	948 ±61	506 ±21
Лимфоциты CD3+CD4+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	174	46,6 ±1,0	15,9 ±0,7
Абсолютное количество	174	612 ±38	143 ±8
Лимфоциты CD3+CD8+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	174	23,1 ±0,8	35,4 ±1,1
Абсолютное количество	174	305 ±21	316 ±13
Лимфоциты CD19+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	174	15,8 ±0,6	23,0 ±1,0
Абсолютное количество	174	205 ±9	204 ±12
Лимфоциты CD3–CD56+		**Среднее ± SD (стандартное отклонение)**	
Параметр:	**n**	**IMMUNO-TROL**	**IMMUNO-TROL Low**
%+	174	8,2 ±0,4	13,2 ±0,6
Абсолютное количество	174	105 ±6	116 ±8

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 4. Точность метода для проточных цитометров Cytomics FC 500 и XL/XL-MCL

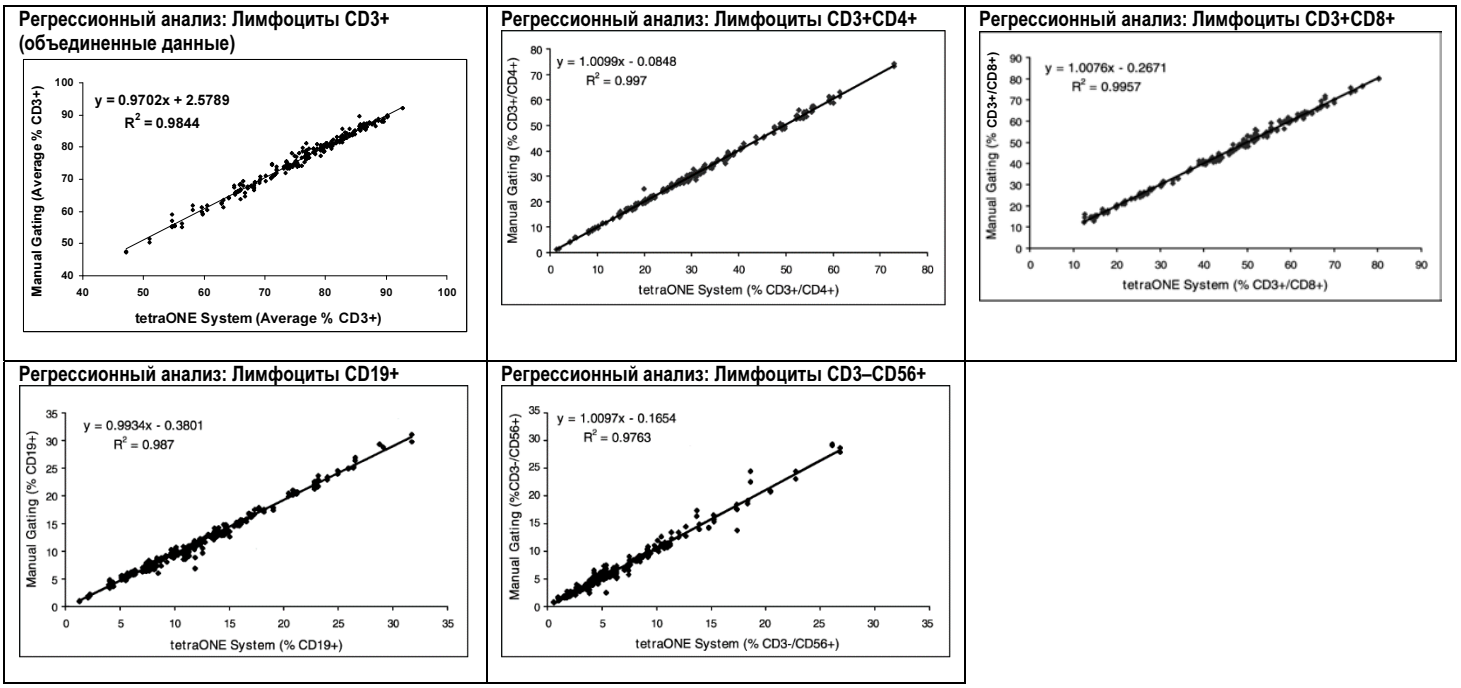
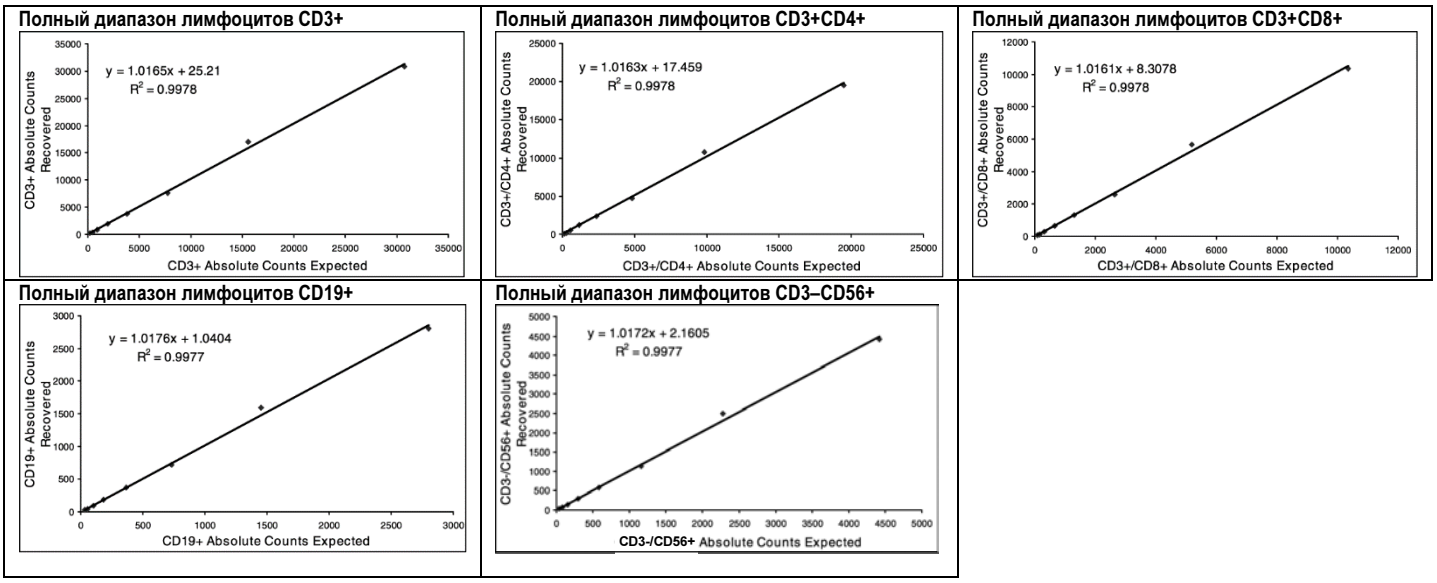


Рисунок 5. Линейность для проточных цитометров Cytomics FC 500 и XL/XL-MCL
ПРИМЕЧАНИЕ. Полученные значения приведены в виде абсолютных значений (клеток/µL).



Проточные цитометры Navios и Navios EX
ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

Проточный цитометр Navios
Оценка степени согласованности значений между реагентами с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 на Navios и приборе сравнения FC 500 с программным обеспечением CXP изучалась на нормальных и патологических пробах лизированной цельной крови с помощью проточной цитометрии. Точность оценивалась сравнением с результатами метода сравнения при использовании оценки разницы как описано в CLSI EP09-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples (Сравнение методов и оценочная погрешность при использовании проб пациента).[52] Эти данные, представленные в Таблицах 1a и 1b и на Рисунках 6 и 7 ниже, подтверждают предположение о том, что данные системы эквивалентны при подсчетах зрелых T, B и NK лимфоцитов в периферической крови. Значения указаны в процентных долях (%) от общего числа лимфоцитов и абсолютного количества (клеток/µL) для клеток CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3–CD56+.

Проточный цитометр Navios EX
Оценка степени согласованности значений между реагентами с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 на Navios EX и приборе сравнения Navios изучалась на нормальных и патологических пробах лизированной цельной крови с помощью проточной цитометрии. Точность оценивалась сравнением с результатами метода сравнения при использовании оценки разницы как описано в CLSI EP09-A3 Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples (Сравнение процедуры измерения и оценочная погрешность при использовании проб пациента).[54] Эти данные, представленные в Таблице 2 и на Рисунках 8a и 8b ниже, подтверждают предположение о том, что данные системы эквивалентны при подсчетах зрелых T, B и NK лимфоцитов в периферической крови. Значения указаны в процентных долях (%) от общего числа лимфоцитов и абсолютного количества (клеток/µL) для клеток CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3–CD56+.

Данные точности, представленные от Navios EX и прибора сравнения Navios, показывают, что результаты, полученные с использованием этих двух цитометров, являются сравнимыми. Следующие разделы (Ожидаемые значения, Линейность, Аналитические диапазоны измерения и Точность) представляют рабочие характеристики обоих проточных цитометров, Navios и Navios EX.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ
Для оценки границ нормальных значений для проточного цитометра Navios проведено исследование нормального диапазона. Пробы цельной крови были собраны у доноров (мужчин и женщин) из трех географически удаленных регионов. Выбор доноров соответствовал указаниям CLSI, EP28-A3, Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory (Определение, установление и проверка эталонных диапазонов в клинической лаборатории).[51]

Пробы окрашивались с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8-ECD/CD3–PC5 и CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56-RD1/CD19–ECD/CD3–PC5. Значения, установленные на проточных цитометрах Navios, отображают общее количество CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3–CD56+ клеток и представлены в таблицах ниже (см. Таблицы 3a и 3b). Абсолютный подсчет был выполнен с использованием метода Flow-Count (SPT).

Полученные значения выражали в процентах (%) от общего числа лимфоцитов, а также как абсолютные значения (клеток/µL).

Для определения эталонного диапазона использовался доверительный интервал 95%.

Эти значения приводятся исключительно как репрезентативные величины. Каждая лаборатория должна установить свой уровень ожидаемых значений, используя местную популяцию здоровых доноров.

ЛИНЕЙНОСТЬ
Три повторных измерения производились для каждого из 19 независимых разбавлений (общее количество CD3+, CD3+CD4+ и CD3+CD8+) и 20 независимых разбавлений (общее количество CD3+, CD19+ и CD3–CD56+) концентрированной пробы контрольных клеток CYTO-TROL. Диапазоны концентраций общего количества лимфоцитов CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD3-CD56+ были установлены посредством окрашивания с использованием реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 или CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 при добавлении флуоросфер Flow-Count и анализа методом проточной цитометрии (проточный цитометр Navios tetra с использованием селектора лимфоцитов). Статистическое определение линейности было выполнено согласно инструкции CLSI EP06-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline (Оценка линейности процедур количественного измерения: статистический подход; утвержденное руководство).[50] См. графики ниже на Рисунке 9. Полученные значения приведены в виде абсолютных значений (клеток/µL).

ДИАПАЗОНЫ АНАЛИТИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ
Предоставленные диапазоны аналитических измерений указывают на возможность анализа подсчета подгрупп лимфоцитов системой Navios. Диапазоны аналитических измерений системы Navios (см. Таблицу 4) получены на основе значений линейности и нижнего предела количественного определения:

- **Линейность:** Диапазоны, в пределах которых результаты прямо пропорциональны количеству аналита в образце согласно инструкции CLSI EP06-A.[50]
- **Нижний предел количественного определения:** Наименьшее количество аналита в образце, которое может быть определено количественным образом с указанным приемлемым уровнем точности и правильности при указанных лабораторных условиях согласно инструкции CLSI EP17-A.[53]

ТОЧНОСТЬ
Процентная доля и абсолютное количество положительно окрашенных клеток определялись при помощи IMMUNO-TROL и низкочисленных клеток IMMUNO-TROL Low Cells в два прохода дважды в день не менее 20 дней в одном центре с использованием реагентов с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 и CD45–FITC/CD56-RD1/CD19–ECD/CD3–PC5. Измерения были выполнены на проточном цитометре Navios. По полученным файлам была выполнена селекция вручную тремя независимыми операторами. Разброс значений от разных операторов рассчитывался в виде общих результатов.

CD45/CD4/CD8/CD3			
IMMUNO-TROL:			
Параметр	**Единицы измерения**	**Среднее значение**	**%CV (коэффициент вариации) (Оператор)**
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	70,95	1,6
	Абсолютное количество (клеток/µL)	754	0,4
CD3+CD4+	% + лимфоциты	45,49	1,3
	Абсолютное количество (клеток/µL)	484	0,9
CD3+CD8+	% + лимфоциты	22,69	0,0
	Абсолютное количество (клеток/µL)	241	2,5
CD45/CD56/CD19/CD3			
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	71,02	1,2
	Абсолютное количество (клеток/µL)	720	0,0
CD19+	% + лимфоциты	14,48	0,8
	Абсолютное количество (клеток/µL)	147	1,9
CD3–CD56+	% + лимфоциты	10,43	0,7
	Абсолютное количество (клеток/µL)	106	0,8

CD45/CD4/CD8/CD3			
IMMUNO-TROL LOW:			
Параметр	**Единицы измерения**	**Среднее значение**	**%CV (коэффициент вариации) (Оператор)**
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	55,77	2,9
	Абсолютное количество (клеток/µL)	336	0,5
CD3+CD4+	% + лимфоциты	21,07	2,2
	Абсолютное количество (клеток/µL)	127	1,4
CD3+CD8+	% + лимфоциты	30,54	1,1
	Абсолютное количество (клеток/µL)	184	2,4
CD45/CD56/CD19/CD3			
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	55,94	1,7
	Абсолютное количество (клеток/µL)	333	0,0
CD19+	% + лимфоциты	19,12	0,6
	Абсолютное количество (клеток/µL)	114	1,3
CD3–CD56+	% + лимфоциты	17,10	1,2
	Абсолютное количество (клеток/µL)	102	0,3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1a. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios в сравнении с селекцией вручную проточного цитометра Cytomics FC 500

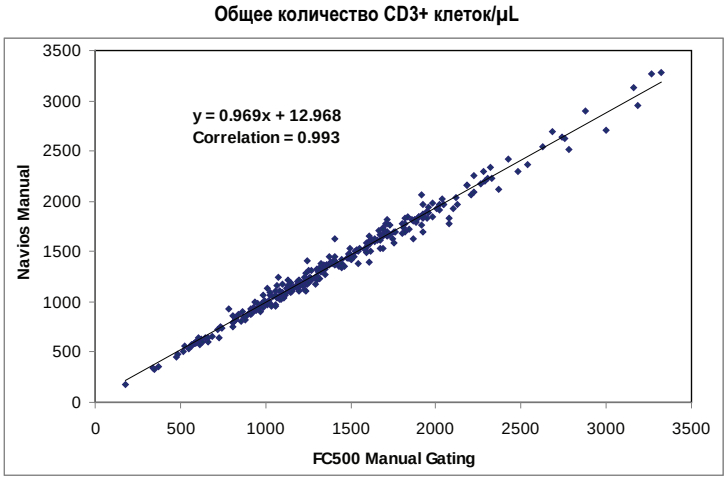
CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 (n=290)					
	Среднее FC 500	**Среднее Navios**	**Корреляция**	**Угловой коэффициент**	**Пересечение**
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	76,69	75,96	0,987	1,010	-1,472
CD3+CD4+	31,47	31,39	0,997	0,984	0,408
CD3+CD8+	43,50	42,67	0,997	0,999	-0,792
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1 415	1 382	0,993	0,969	12,968
CD3+CD4+	591	584	0,996	0,983	3,091
CD3+CD8+	794	765	0,996	0,968	-0,719
CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (n=294)					
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	76,47	75,99	0,991	1,004	-0,742
CD19+	12,10	12,08	0,995	1,000	-0,016
CD3–CD56+	8,11	8,04	0,987	0,986	0,048
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1 417	1 406	0,992	0,994	-1,017
CD19+	229	228	0,995	1,012	-2,973
CD3–CD56+	146	145	0,988	0,980	1,195

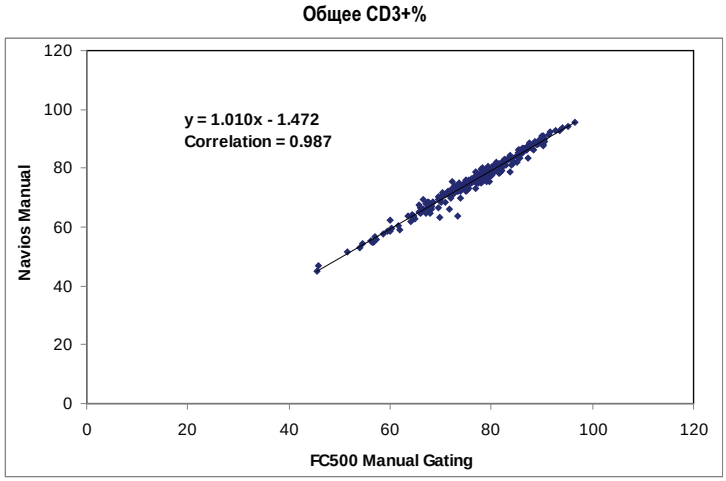
Таблица 1b. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios в сравнении с проточным цитометром Cytomics FC 500 с программным обеспечением tetraCXP

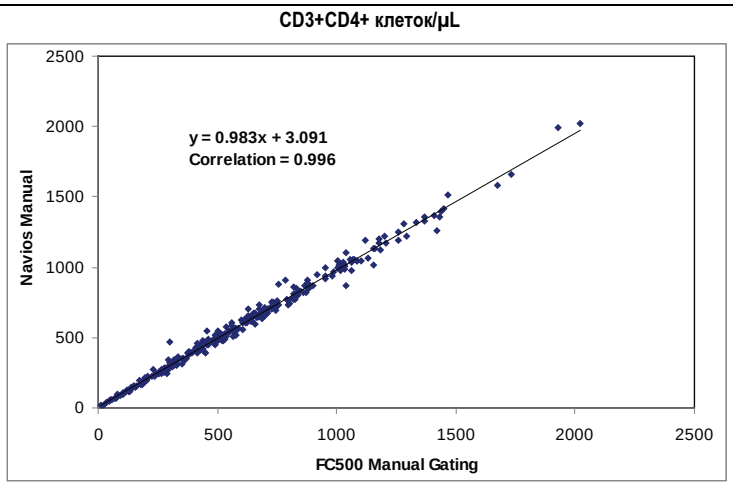
CD45–FITC/CD4–RD1/CD8–ECD/CD3–PC5 (n=287)					
	Среднее FC 500	**Среднее Navios**	**Корреляция**	**Угловой коэффициент**	**Пересечение**
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	77,95	75,98	0,982	0,988	-1,022
CD3+CD4+	31,35	31,07	0,996	0,980	0,448
CD3+CD8+	44,64	43,02	0,996	0,987	-0,978
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1 366	1 383	0,988	1,001	17,487
CD3+CD4+	562	579	0,994	1,034	2,755
CD3+CD8+	772	771	0,992	0,995	3,559
CD45–FITC/CD56–RD1/CD19–ECD/CD3–PC5 (n=287)					
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	78,00	76,19	0,988	0,999	-1,712
CD19+	12,04	12,03	0,994	1,000	-0,012
CD3–CD56+	7,87	7,96	0,987	0,996	0,133
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1 374	1 415	0,989	1,029	1,754
CD19+	217	228	0,994	1,033	4,095
CD3–CD56+	136	145	0,989	1,049	2,189

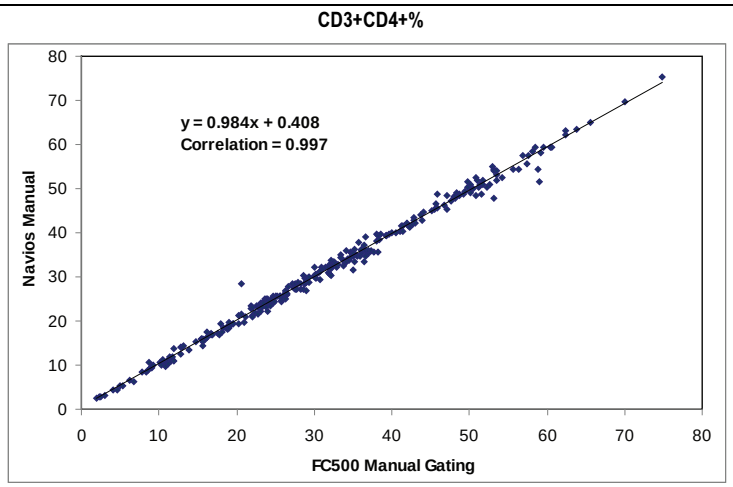
Рисунки 6a и 6b. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios в сравнении с селекцией вручную проточного цитометра Cytomics FC 500

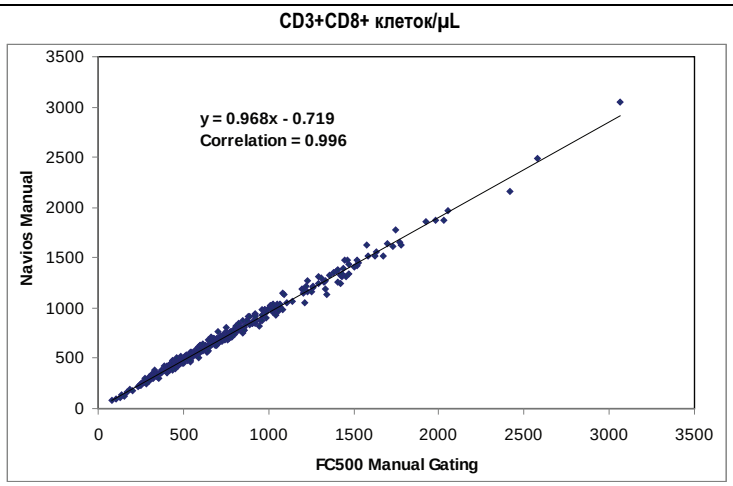
6a. CD45/4/8/3:

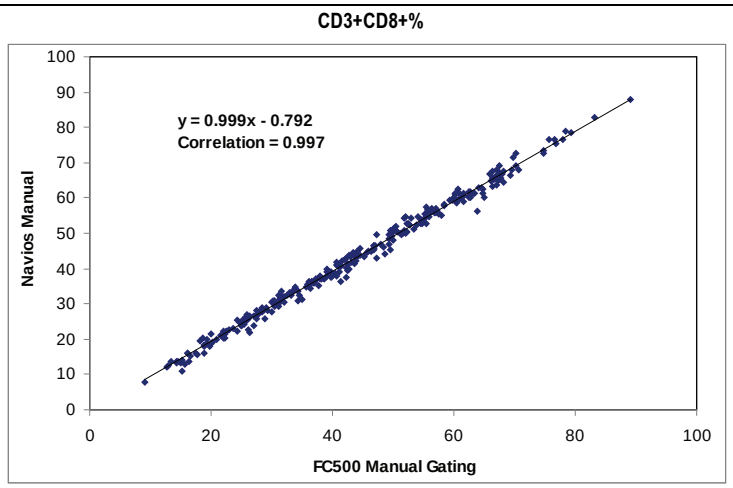






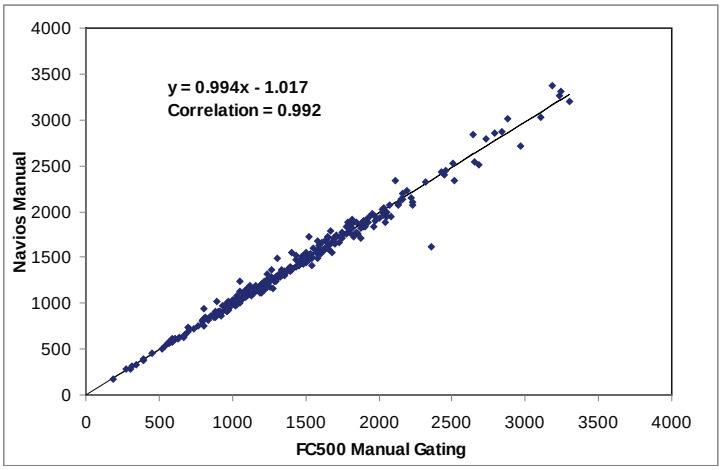




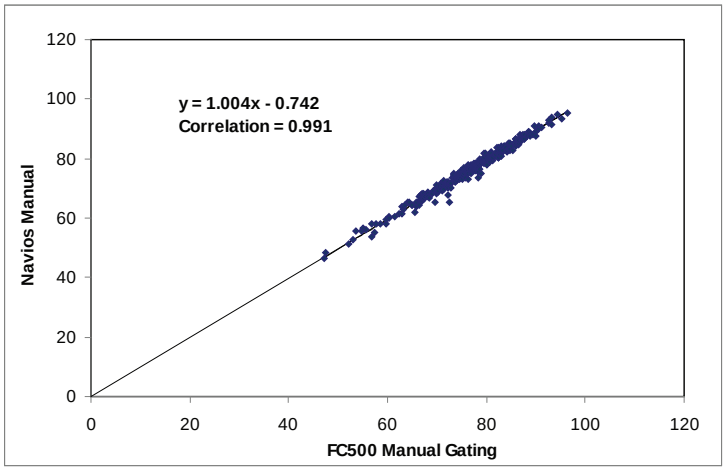


6b. CD45/56/19/3:

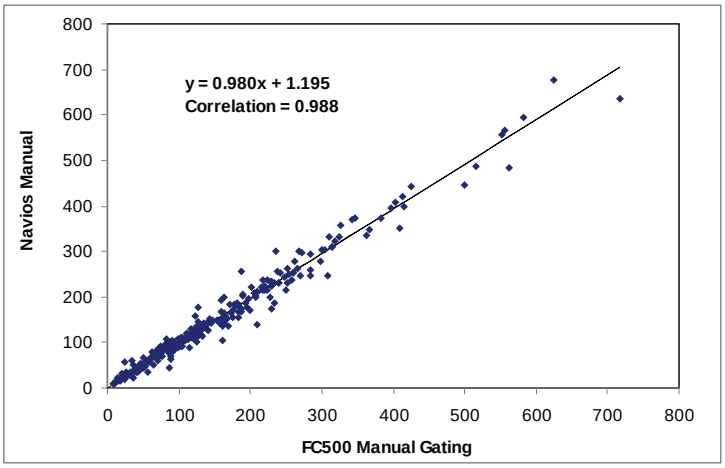
Общее количество CD3+ клеток/µL



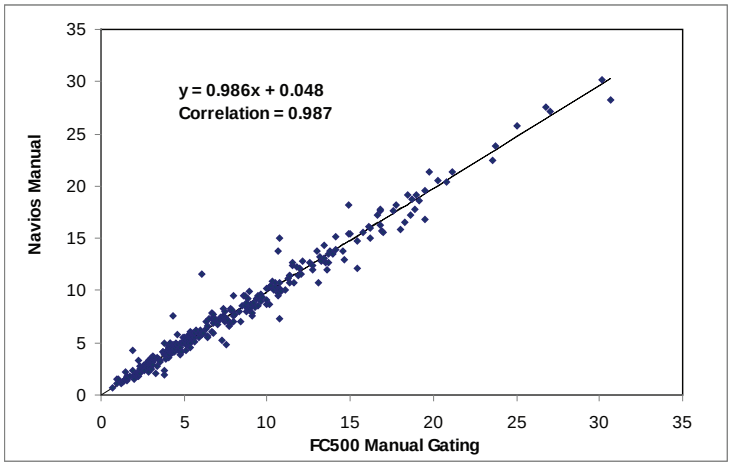
Общее CD3+%



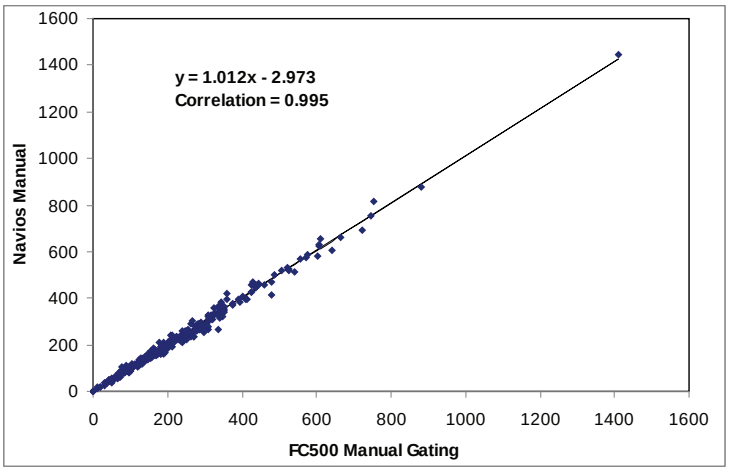
CD3–CD56+ клеток/µL



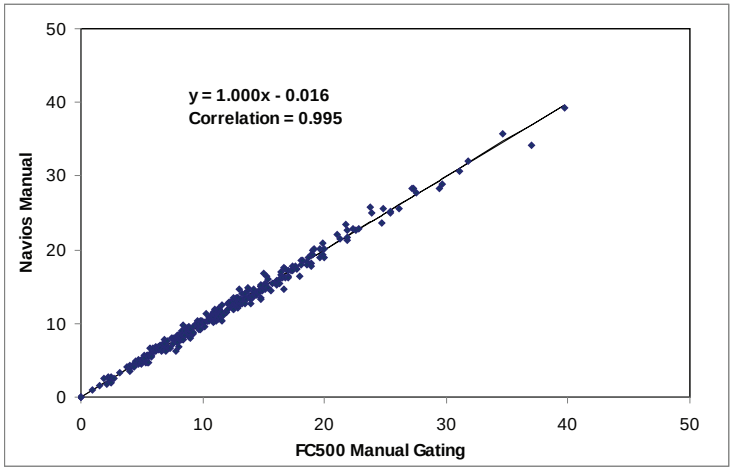
CD3–CD56+%



CD19+ клеток/µL

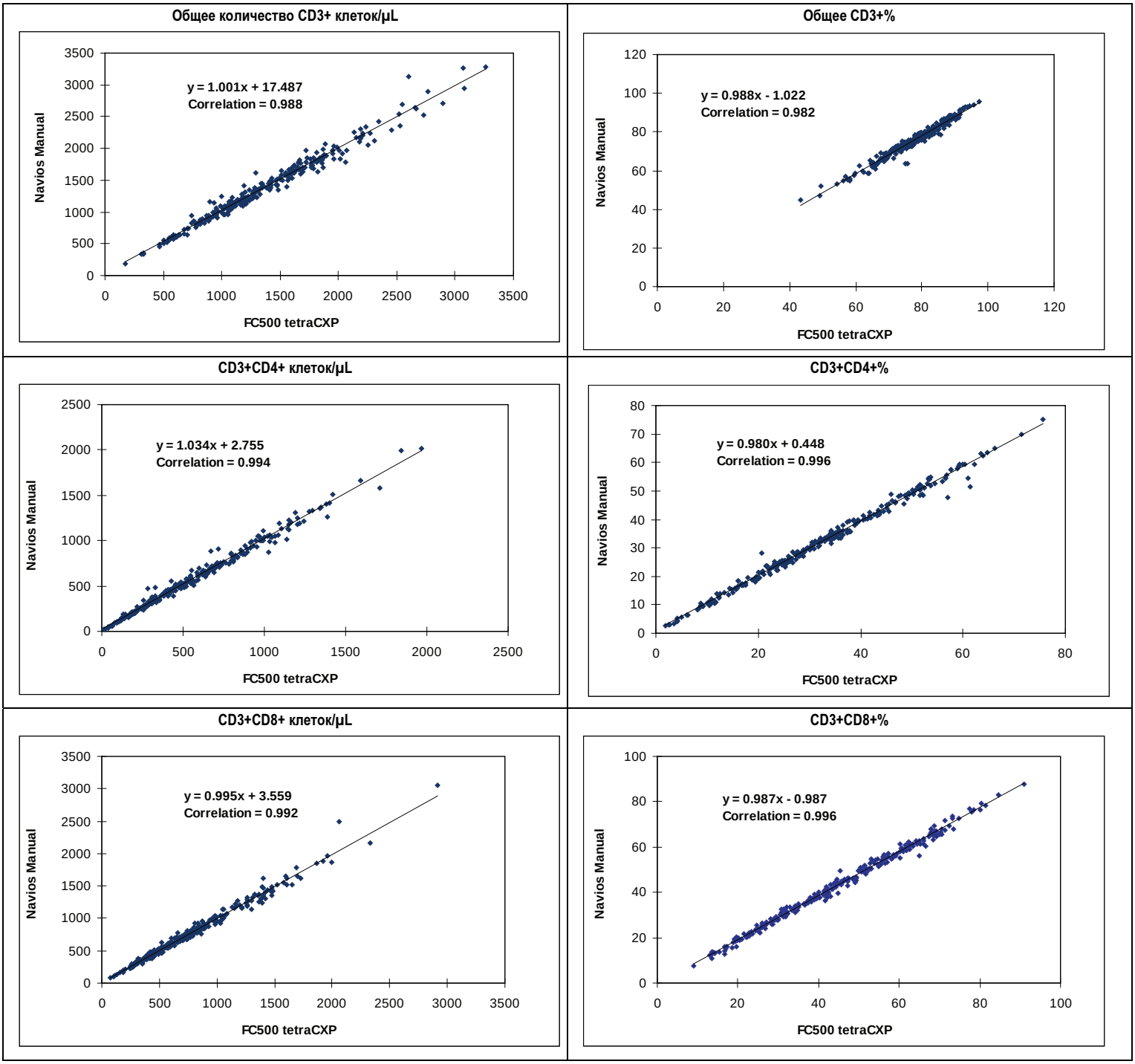


CD19+%

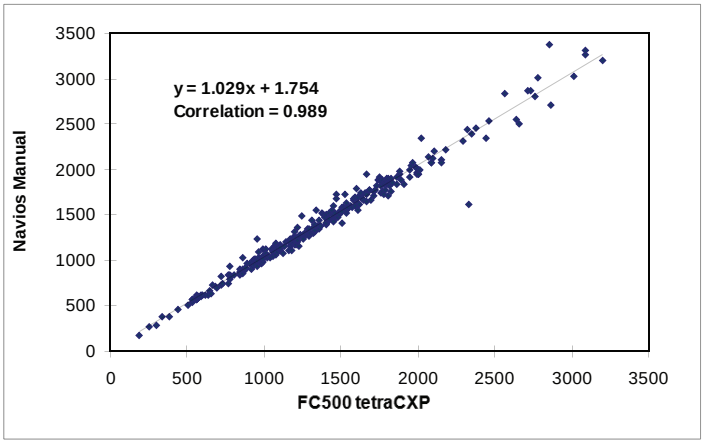


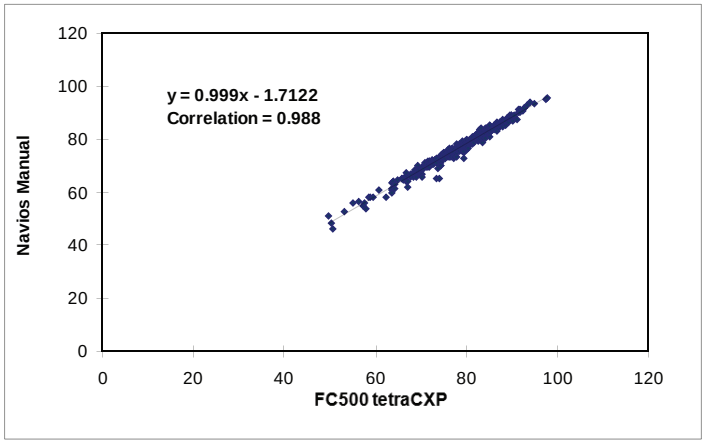
Рисунки 7a и 7b. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios в сравнении с проточным цитометром Cytomics FC 500 с программным обеспечением tetraCXP

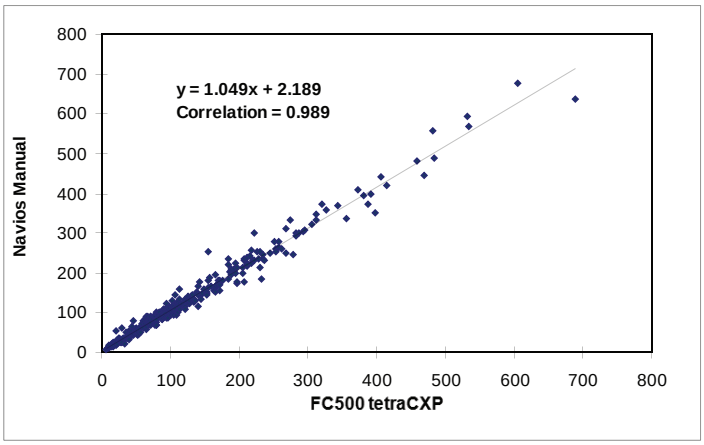
7a. CD45/4/8/3:

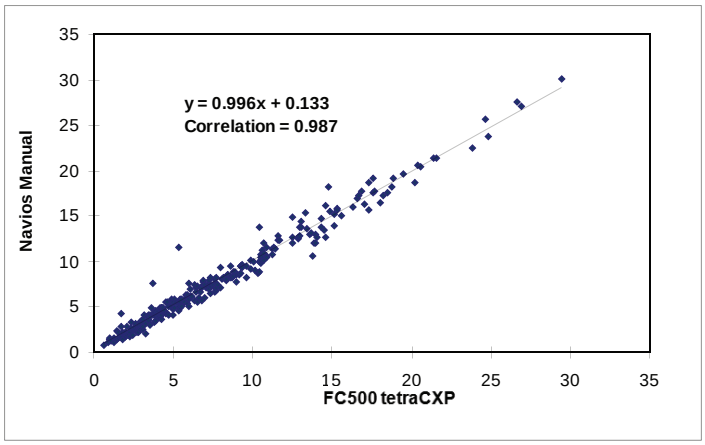


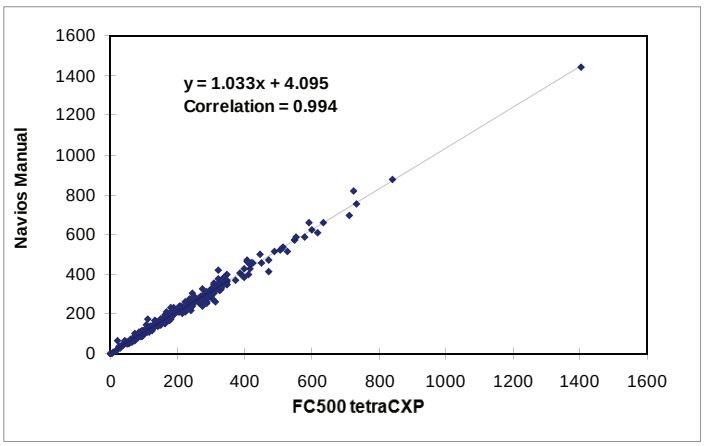
7b. CD45/56/19/3:











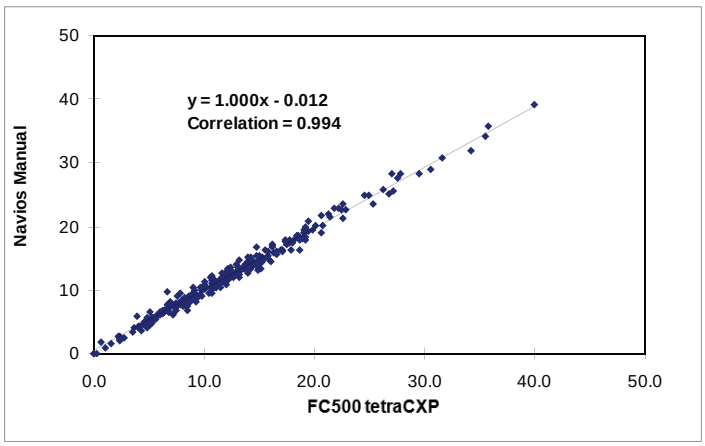
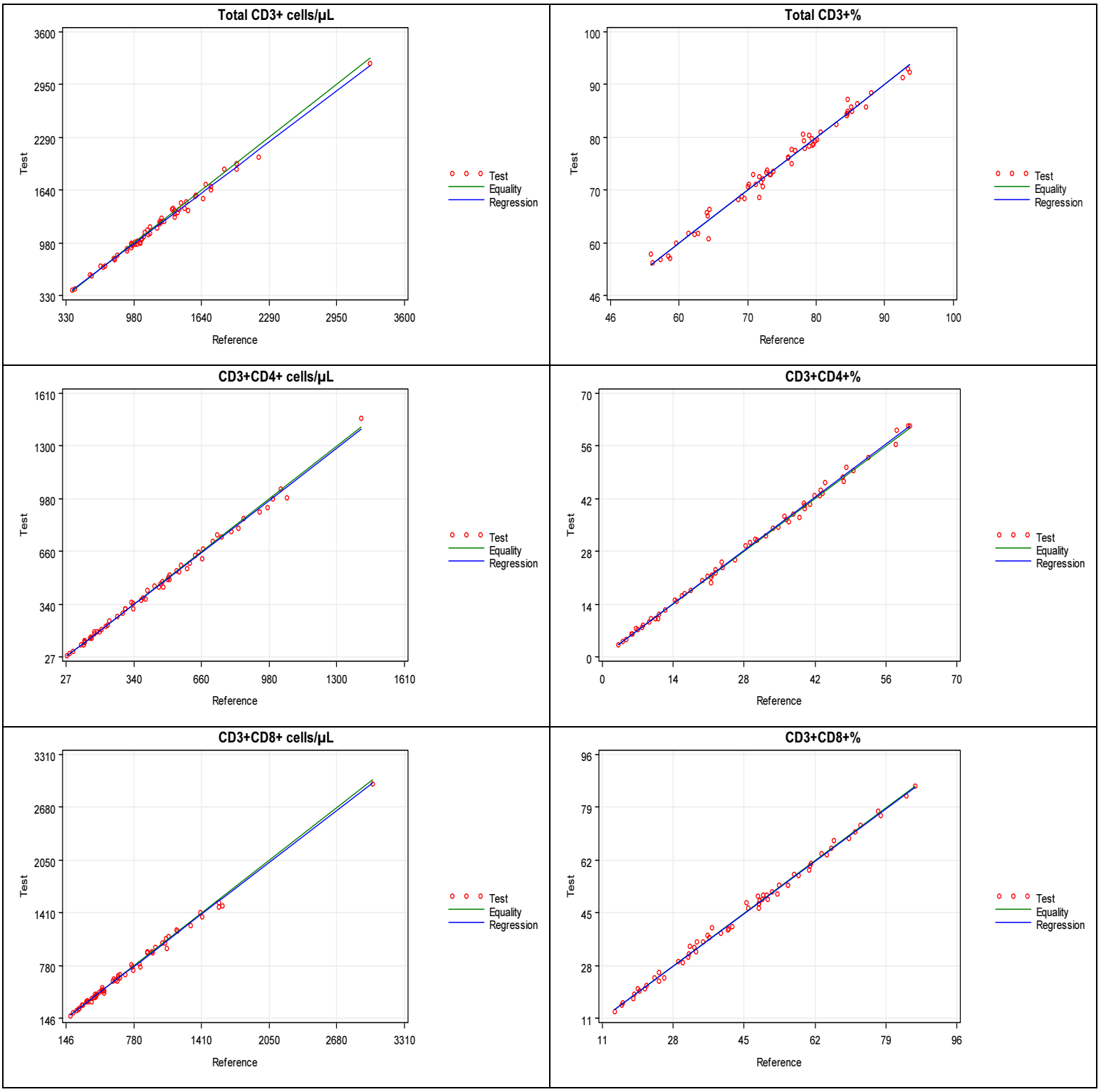


Таблица 2. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios EX в сравнении с селекцией вручную проточного цитометра Navios

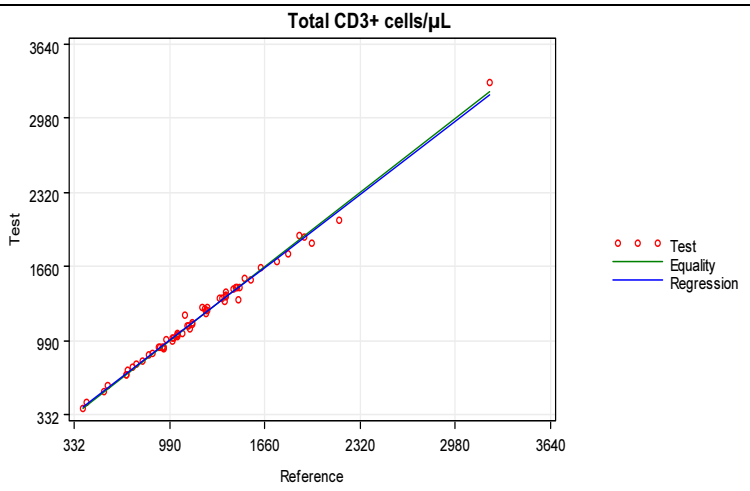
CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (n=60)					
	Среднее Navios	**Среднее Navios EX**	**Корреляция**	**Угловой коэффициент**	**Пересечение**
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	74,48	74,46	0,992	1,003	-0,263
CD3+CD4+	28,04	28,30	0,999	1,006	0,086
CD3+CD8+	44,56	44,40	0,998	0,993	0,151
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1222	1203	0,996	0,967	20,237
CD3+CD4+	454	450	0,998	0,988	2,419
CD3+CD8+	740	727	0,998	0,990	-3,374
CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (n=59)					
% + лимфоциты					
Общее количество CD3+	74,20	74,27	0,995	1,000	0,081
CD19+	13,24	13,44	0,996	1,007	0,097
CD3–CD56+	8,59	8,36	0,996	0,987	-0,119
клеток/µL					
Общее количество CD3+	1208	1209	0,997	0,986	17,260
CD19+	226	231	0,997	1,036	-2,502
CD3–CD56+	136	132	0,994	0,963	0,666

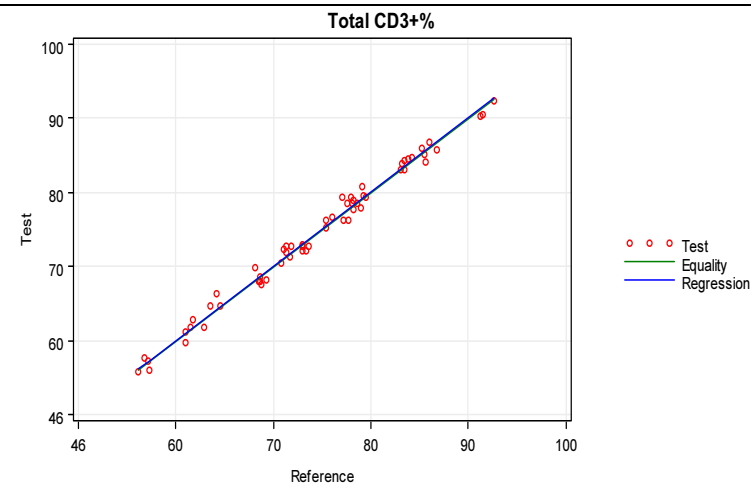
Рисунки 8a и 8b. Точность регрессии для селекции вручную проточного цитометра Navios EX в сравнении с селекцией вручную проточного цитометра Navios

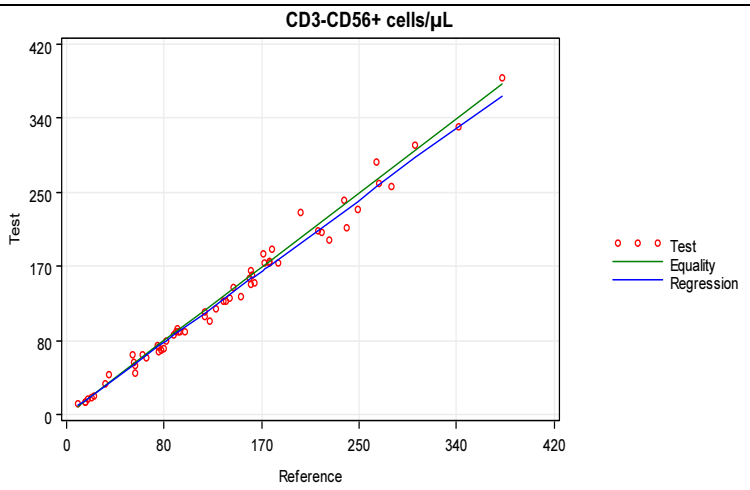
8a. CD45/4/8/3:

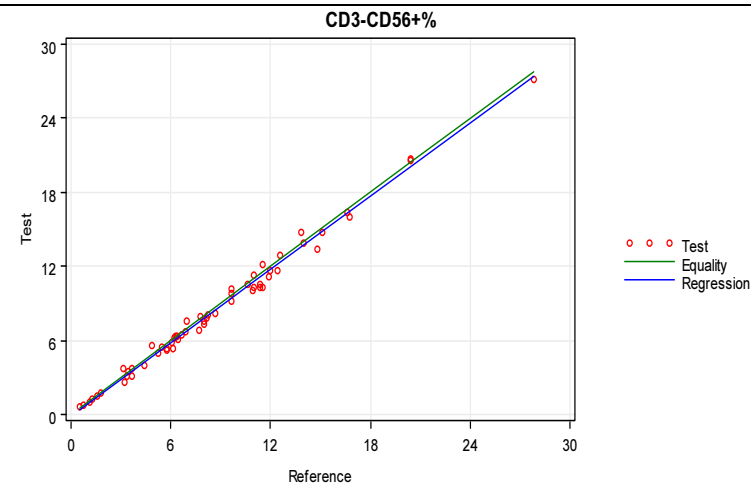


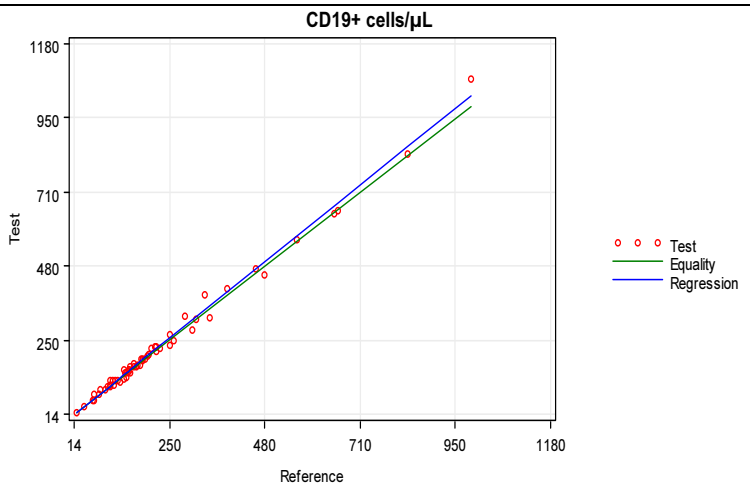
8b. CD45/56/19/3:











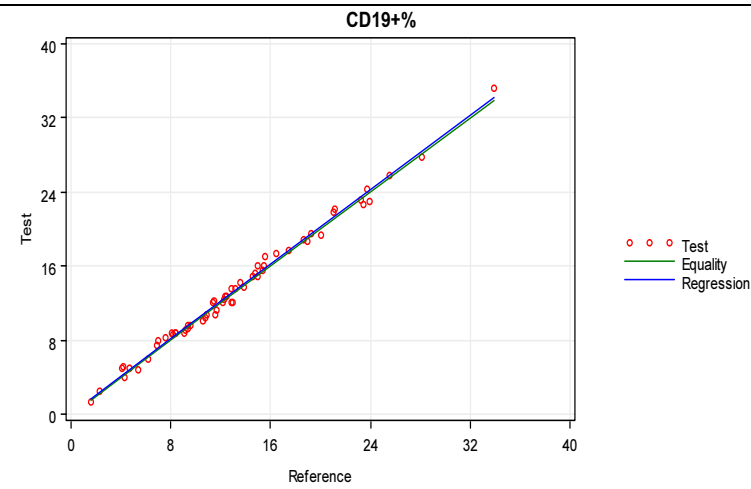


Таблица 3a. Проточный цитометр Navios, ожидаемые значения: CD45/CD4/CD8/CD3

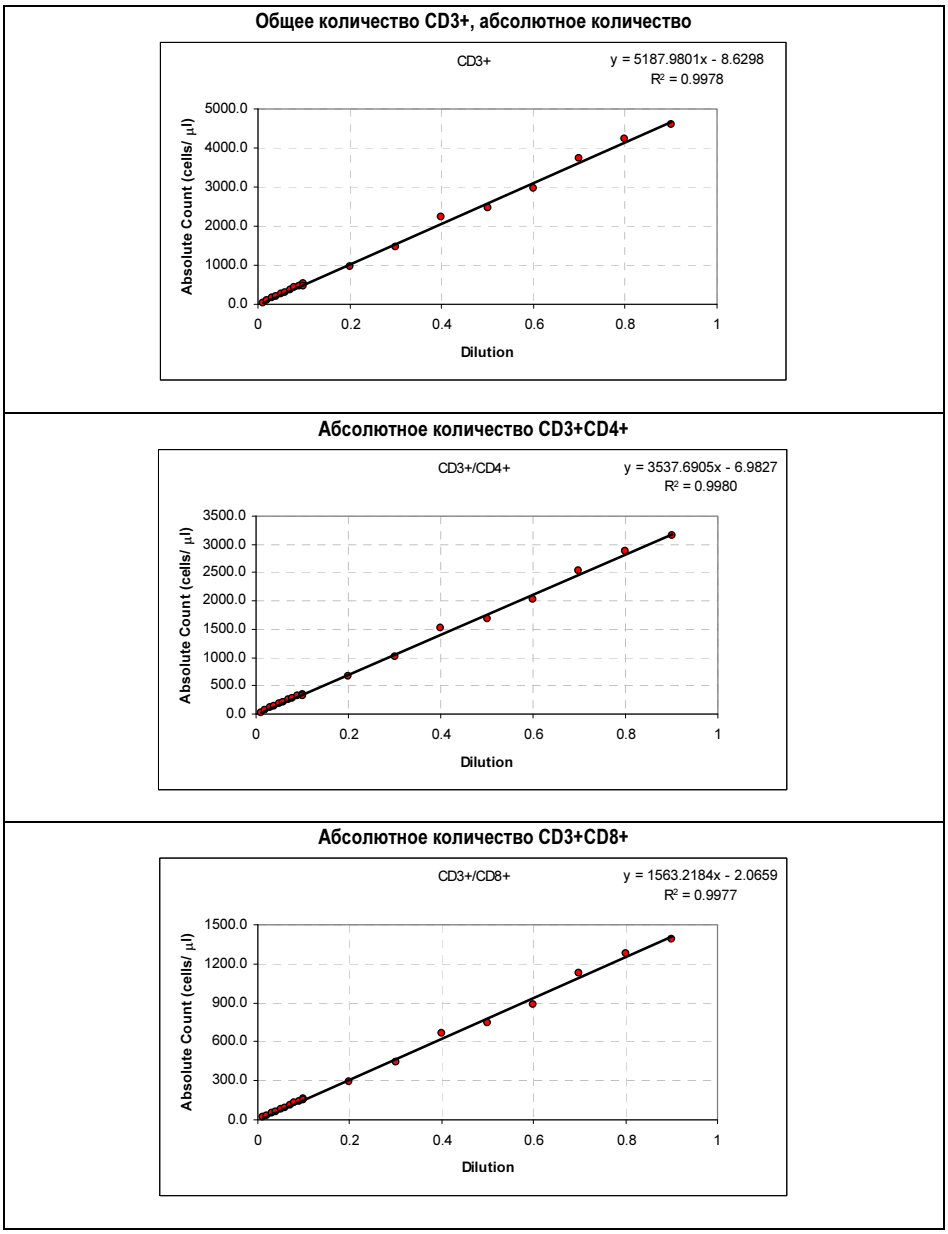
Параметр	Единицы измерения	n	Среднее значение	Нижний предел	Верхний предел
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	144	73,58	57,89	87,13
Общее количество CD3+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	1 458	668	2 291
CD3+CD4+	% + лимфоциты	144	48,31	28,37	64,64
CD3+CD4+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	956	433	1 692
CD3+CD8+	% + лимфоциты	144	23,92	11,83	40,05
CD3+CD8+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	476	147	1 068

Таблица 3b. Проточный цитометр Navios, ожидаемые значения: CD45/CD56/CD19/CD3

Параметр	Единицы измерения	n	Среднее значение	Нижний предел	Верхний предел
Общее количество CD3+	% + лимфоциты	144	73,49	57,57	86,77
Общее количество CD3+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	1 476	754	2 428
CD19+	% + лимфоциты	144	13,38	4,24	24,98
CD19+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	269	79	574
CD3–CD56+	% + лимфоциты	144	9,79	2,44	25,79
CD3–CD56+	Абсолютное количество (клеток/µL)	144	193	38	561

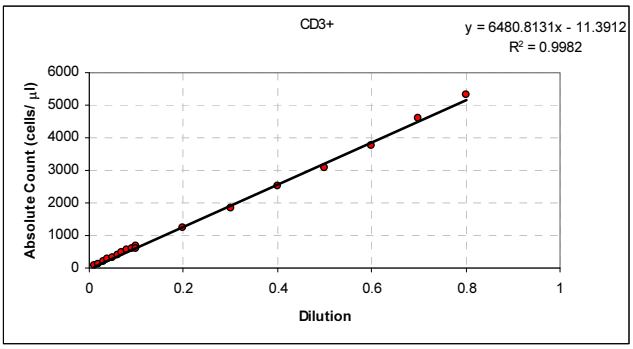
Рисунки 9a и 9b. Линейность селекции вручную проточного цитометра Navios
ПРИМЕЧАНИЕ. Полученные значения приведены в виде абсолютных значений (клеток/µL).

9a. CD45/4/8/3:

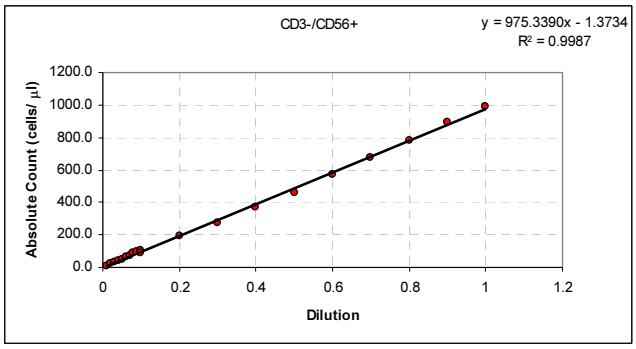


9b. CD45/56/19/3:

Общее количество CD3+, абсолютное количество



Абсолютное количество CD3–CD56+



Абсолютное количество CD19+

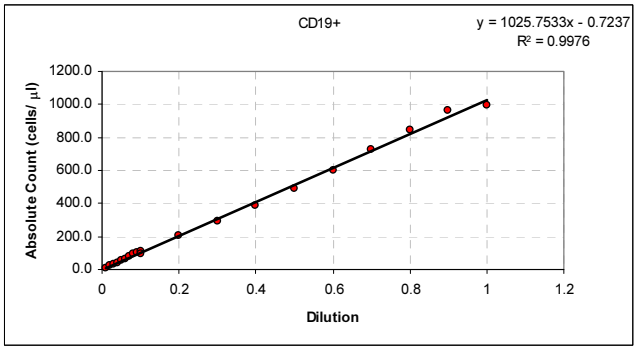


Таблица 4. Диапазоны аналитических измерений Navios

tetraCHROME	Параметры	Единицы измерения	Диапазоны аналитических измерений Navios	Диапазоны аналитических измерений Navios EX
CD45/4/8/3	Общее количество CD3+	клеток/µL	65–4 500	65–3200
	CD3+CD4+	клеток/µL	35–3 000	35–2000
	CD3+CD8+	клеток/µL	15–1 300	15–2000
CD45/56/19/3	Общее количество CD3+	клеток/µL	65–4 500	65–3200
	CD3–CD56+	клеток/µL	35–900	35–650
	CD19+	клеток/µL	35–900	35–900

ССЫЛКИ

1. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF and Todd RF, eds. Leukocyte Typing V. Oxford, UK: Oxford University Press, 1995, Vol. 1. pp. 262, 263, 268, 270, 507-511; Vol. 2. pp. 1398-1400.
2. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. Leukocyte Typing. Springer-Verlag, New York; 1984, pp. 28, 41-42, 44,196.
3. McMichael AJ, ed. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, 1987, pp. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 170-172, 176, 199, 202, 206, 302-308, 315, 475, 796-801.
4. Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le J-M, Tantravahi R, and Ritz J. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. Experimental Hematology, 1996, 24:406-415.
5. Foon KA and Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood, 1986, 68:1-31.
6. Newman, W Targan SF, and Fast LD. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. Mol Imm, 1984, 21:1113-1121.
7. Coffman RL and Weissman IL. B220: A B cell specific member of the T-200 glycoprotein family. Nature, 1981, 289:681-693.
8. Dalchau R and Fabre JW. Identification with a monoclonal antibody of predominantly B lymphocyte specific determinant of the human leucocyte common antigen. J Exp Med, 1980, 153:753-757.
9. Omary MB, Trowbridge IS and Battifora HA. Human homologue of murine T-200 glycoprotein. J Exp Med, 1980, 152:842-852.
10. Dalchau R, Kirkley J and Fabre JW. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte common (L-C) antigen of rat. Eur J Immunol, 1981, 10:737-744.
11. Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, and von dem Borne AEGKr., eds. Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens. Oxford, UK: Oxford University Press, 1989, pp. 536, 541, 699-702.
12. Reinherz EL and Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell, 1980, 19:821-827.
13. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell, 1982, 30:735-743.
14. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature, 1983, 303:808-810.
15. Reinherz EL, Meuer SC, and Schlossman SF. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunology Today, 1983, 4:5-8.
16. Reinherz EL, Morimoto C, Fitzgerald KA, Hussey RE, Daley JF, and Schlossman SF. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J Immunol, 1982, 128:463-468.
17. de Martini RN and Parker JW. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal, 1989, 3:56-70.
18. Caligiuri M, Murray C, Buchwald D, Levine H, Cheney P, Peterson D, Komaroff AL and Ritz J. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. J Immunol, 1987, 139:3306-3313.
19. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Samoza C, Williams AF eds. The Leucocyte Antigen Facts Book. London: Academic Press, 1993, pp. 106-109.
20. Tedder TF and Isaacs CM. Isolation of a cDNA encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes: a new member of the immunoglobulin superfamily. J Immunol, 1989, 143:712-717.
21. Griffin JD, Hercend T, Beveridge RP, and Schlossman SF. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. J Immunol, 1983, 130:2947-2951.
22. Hercend T, Griffin JD, Bensussan A, Schmidt RE, Edson MA, Brennan A, Marray C, Daley JF, Schlossman SF, and Ritz J. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. J Clin Invest, 1985, 75:932-943.
23. Schmidt RE, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, and Ritz J. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. J Exp Med, 1986, 164:351-356.
24. Schmidt RE, Michon JM, Woronicz J, Schlossamn SF, Reinherz EL, and Ritz J. 1987. Enhancement of natural killer function through activation of the T11 E rosette receptor. J Clin Invest 79:305-308.
25. Benjamini E and Leskowitz S. Immunology: A Short Course. Second Edition. New York: Wiley-Liss, 1991, 211-244.
26. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol, 1980, 125:1269-1274.
27. Felsenstein D, Carney WP, Lacoviello VR and Hirsch MS. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus induced mononucleosis. J Infect Dis, 1985, 152:198-203.
28. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun, 1983, 40:472-477.
29. Goldstein G, Lifter J and Mittler R. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Fabre JW, eds. New York, NY: Academic Press, 1982, pp. 39-70.
30. Schmidt RE: Monoclonal antibodies for diagnosis of Immunodeficiencies. Blut, 1989, 59:200-206.
31. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood, 1989, 74:2203-2211.
32. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, Van Leeuwen E, Capel PJA and Haanen C. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WTI-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood, 1989, 74:1152-1158.
33. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation, 1989, 47:465-471.
34. Fauci AS: The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science, 1988, 239:617-622.
35. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. Adv Immunol, 1989, 47:187.
36. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV: CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS, 1989, 2:114-124.
37. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. MMWR, 2003: 52 (No. RR-2):1-13.
38. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Edition (H3). Clinical and Laboratory Standards Institute.
39. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry, 1990, 11:453-459.
40. Nicholson JKA, Hubbard M and Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry), 1996, 26:16-21.
41. Cosimi AB, Colvin RB, Burton RC, Rubin RH, Goldstein G, Kung PC, Hansen WP, Delmonico FL and Russell PS. 1981. Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. N. Engl. J. Med., 305:308-314.
42. Kaufman A, Herold KC. Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 2009 May; 25(4):302-6.
43. Frankel AE, Zuckero SL, Mankin AA, Grable M, Mitchell K, Lee YJ, Neville DM,Woo JH. Anti-CD3 recombinant diphtheria immunotoxin therapy of cutaneous T cell lymphoma. Curr Drug Targets. 2009 Feb; 10(2):104-9.
44. Koepke JA and Landay AL. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol, 1989, 52:19-27.
45. Brunetta E, Hudspeth KL, Mavilio D. Pathologic Natural Killer Cell Subset Redistribution in HIV-1 infection: New Insights in Pathophysiology and Clinical Outcomes. Journal of Leukocyte Biology 2010;88 (Epub ahead of print 07/22/2010).
46. Alter G, Malenfant JM, Delabre RM, Burgett NC, Yu XG, Lichterfeld M, Zaunders J, Altfeld M. Increased Natural Killer Cell Activity in Viremic HIV-1 Infection. The Journal of Immunology 2004(173):5305-5311.
47. CDC: 1997 Revised Guidelines for Performing CD4+ T-Cell Determinations in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). MMWR 1997; 46 (RR-2); 1-29.
48. H42-A2 CLSI: Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry: Approved Guideline – 2nd Edition 2007.
49. Zloza, et al. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. Journal of Leukocyte Biology 2006:79(4-6).
50. EP06-A CLSI: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline.
51. EP28-A3c CLSI: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, Third Edition.
52. EP09-A2 CLSI: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline.
53. EP17-A CLSI: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline.
54. EP09-A3 CLSI: Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-Third Edition.

ПРЕДЛАГАЕМАЯ ПРОДУКЦИЯ

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

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

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

За дополнительной информацией или при получении поврежденной продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с вашим местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821, U.S.A.
www.beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Тел.: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

История редакций

Редакция AB, 04/2017

Изменения были внесены в:

- НАЗНАЧЕНИЕ
- ПРИНЦИПЫ ТЕСТА
- Таблица 4. Диапазоны аналитических измерений Navios

Редакция AC, 09/2017

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки

Редакция AD, 12/2018

Изменения были внесены в:

- Добавить новые языки
- Удалено (COULTER EPICS XL/XL-MCL)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Клетки IMMUNO-TROL

Инструкции по применению

REF **6607077 - 60 тестов**

Ч.№ 4238090-LN

CE BECKMAN COULTER

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Клетки IMMUNO-TROL – это анализируемый, подверженный лизису продукт контроля качества цельной крови для иммунофенотипического анализа с использованием моноклональных антител и проточной цитометрии. Он обеспечивает положительный клеточный контроль, обрабатываемый так же, как и пробы цельной крови. Это позволяет проверить работу реагентов и методы, использованные для отметки клеток-мишеней, лизиса эритроцитов и анализа проб с помощью проточной цитометрии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Иммунофенотипический анализ с использованием проточной цитометрии состоит в идентификации и подсчёте клеток-мишеней в пробах цельной крови. Перед проведением анализа проточной цитометрией пробы цельной крови помечаются моноклональными антителами и содержащиеся в них эритроциты лизируются. Положительный клеточный контроль необходим для проверки работы реагентов и методик подготовки проб и мечения.[1,2] Положительный клеточный контроль должен имитировать пробу цельной крови при сравнении работы моноклональных антител, лизиса эритроцитов и анализа проточной цитометрией.

Клетки IMMUNO-TROL являются жидким препаратом стабилизированных человеческих эритроцитов и лейкоцитов (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов), обладающих способностью к лизису, светорассеянию, экспрессии антигенов и связыванию с антителами, соответствующей норме для цельной человеческой крови.

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Клетки IMMUNO-TROL содержат два основных клеточных компонента: лейкоциты и эритроциты. Лейкоциты выполняют функцию положительного клеточного контроля клеток IMMUNO-TROL и несут представленные на клетках-мишенях поверхностные антигены, которые связывают моноклональные антитела из реагента. Эритроциты выполняют функцию лизируемого компонента клеток IMMUNO-TROL. Пробы IMMUNO-TROL сначала помечаются моноклональными антителами, а затем лизируются для удаления эритроцитов. Флуоросферы добавляются по необходимости для прямого определения абсолютного количества. Анализ проточной цитометрией помеченных и лизированных проб IMMUNO-TROL позволяет определить процент и абсолютное количество клеток-мишеней. ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ определяются на утверждённых и стандартизированных проточных цитометрах FC 500, Navios и Navios EX с использованием системы реагентов IMMUNOPREP с рабочей станцией TQ-Prep для лизиса эритроцитов, реагенты с моноклональными антителами COULTER CYTO-STAT, CYTO-STAT/COULTER CLONE, и IOTest для отметки поверхностных антигенов лейкоцитов и Flow-Count Fluorospheres для прямого определения абсолютного количества.

РЕАГЕНТ

Клетки IMMUNO-TROL являются жидким препаратом стабилизированных человеческих эритроцитов и лейкоцитов в стабилизирующем растворе, содержащем БСА.

Показания: не применимо.

Противопоказания: не применимо.

Побочные эффекты: не применимо.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Неомицина сульфат <0,1%
Пенициллин G, натриевая соль <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

1. Этот реагент содержит <0,1% азида натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. Во время утилизации соединения азида следует смывать проточной водой. Рекомендуется соблюдать эти предосторожности, чтобы избежать образования отложений в металлических трубах с развитием взрывоопасных условий. При попадании в глаза или на кожу, тщательно промойте водой.
2. **ПОТЕНЦИАЛЬНО БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЙ МАТЕРИАЛ**
   Кровь каждого донора, использованная при изготовлении этого материала, была протестирована одобренным FDA методом на наличие антител к вирусам иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и гепатита С (ВГС), а также на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и признана негативной (была повторно нереактивна). Поскольку ни один метод исследования не обеспечивает полной гарантии отсутствия ВИЧ, ВГС, вируса гепатита В (ВГВ) или других инфекционных агентов, работать с реагентом следует в условиях Biosafety Level 2, как рекомендуется в Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 1988 при работе с любыми образцами человеческой сыворотки или крови, потенциально содержащими инфекционные заболевания.
3. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта проб с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не замораживайте реагенты.
5. Избегайте бактериального загрязнения реагентов для предотвращения получения ошибочных результатов.
6. Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этим реагентом.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Не используйте реагент после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.

Невскрытый реагент сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Открытый реагент сохраняет стабильность в течение 90 дней после вскрытия при хранении при температуре 2-8°C. Не замораживать.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Невозможность получения ожидаемых результатов или изменение светорассеяния либо параметров флуоресценции могут свидетельствовать о разрушении продукта. Так же необходимо изучить стандартизацию прибора, методику подготовки пробы и реагентов, методику метки антителами и действие антител. Гемолиз может свидетельствовать о неправильных условиях хранения, что может повлиять на подверженность продукта лизису и препятствовать его действию.

ПРОЦЕДУРА

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизирован по интенсивности флуоресценции в соответствии с указаниями производителя и лаборатории.
2. Доведите контрольный реагент и антитела до комнатной температуры.
3. Промаркируйте пробирки для антител, которые будут использованы на тестовых пробах.
4. Следуя рекомендуемой процедуре метки антителами, отмерьте пипеткой положенный объем антител в соответствующую промаркированную тест-пробирку.
5. Аккуратно вращайте пробирку с контрольным реагентом для перемешивания продукта так же, как при работе с образцом цельной крови.
6. Отмерьте 100 µL контрольного реагента в каждую из тест-пробирок. Аккуратно смешайте, пользуясь вращательной мешалкой.
7. Инкубируйте антитело и контроль, следуя процедуре метки антителами.

ВАЖНО: Если капли реагента остаются у края тест-пробирки, их следует удалить, иначе нелизированные красные кровяные клетки могут загрязнить образец и исказить результаты. Для их удаления можно использовать ватную палочку.

8. Лизируйте помеченный контроль в соответствии с методикой подготовки пробы.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании флуоросфер Flow-Count, перемешайте флакон с флуоросферами Flow-Count на вращательной мешалке и добавьте 100 µL в каждую тест-пробирку, для которой необходим результат в абсолютных числах.

9. Проанализируйте пробу на проточном цитометре, следуя процедуре анализа для данного реагента с антителами. Искомая популяция указана в ТАБЛИЦЕ ОЖИДАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании флуоросфер Flow-Count подготовленные пробы должны быть проанализированы в течение 2 часов после добавления флуоросфер Flow-Count в соответствующую тест-пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 1. Образец двухпараметрической гистограммы, сравнивающей боковое рассеяние (SS) с рассеянием вперёд (FS) клеток IMMUNO-TROL, лизированных с помощью системы реагентов IMMUNOPREP и рабочей станции TQ-Prep, и анализированных на проточном цитометре Navios.

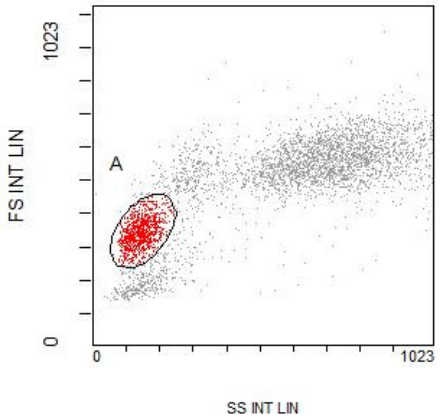


Рисунок 2. Образец двухпараметрической гистограммы соотношения CD45 и бокового рассеяния (SS) клеток IMMUNO-TROL, лизированных с помощью системы реагентов IMMUNOPREP и рабочей станции TQ-Prep, и анализированных при помощи Navios tetra на проточном цитометре Navios.

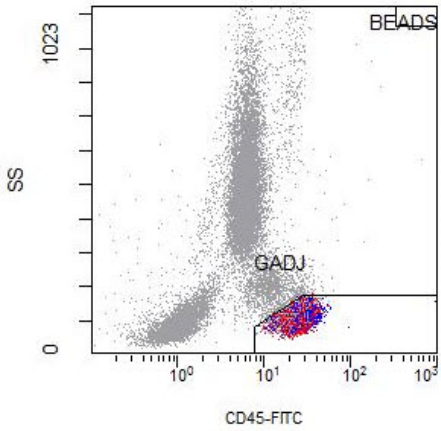
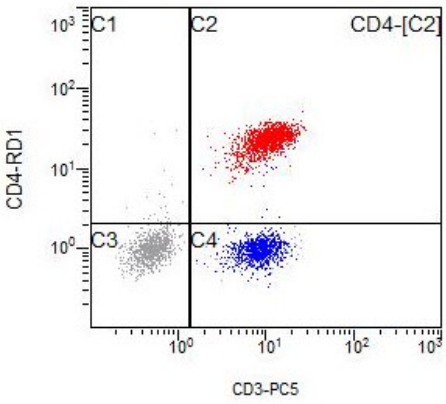


Рисунок 3. Образец двухпараметрической гистограммы соотношения CD3 и CD4 клеток IMMUNO-TROL, помеченных моноклональным антителом CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/ CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, лизированных с помощью системы реагентов IMMUNOPREP и рабочей станции TQ-Prep, и анализированных с помощью Navios tetra на проточном цитометре Navios.



ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние значения определяются для каждого антигена с проточных цитометрах FC 500, Navios и Navios EX, системы реагентов IMMUNOPREP, рабочей станции TQ-Prep, антител CYTO-STAT, CYTO-STAT/ COULTER CLONE, или IOTest и, при необходимости, флуоросфер Flow-Count. При этих условиях 95% восстановленных значений должны уложиться в рамки установленного диапазона ожидаемых значений. В каждой лаборатории следует установить свои среднее и диапазон ожидаемых значений для каждого анализируемого антигена. Участие в межлабораторной программе обеспечения качества Beckman Coulter (IQAP) предоставляет возможность сравнения своей работы с работой других лабораторий и улучшает программу обеспечения качества работы лаборатории.

ВАЖНО: Данный контроль нельзя использовать в сочетании со следующими реагентами: CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/ B4-RD1, CYTO-STAT/COULTER CLONE B4-FITC, CYTO-STAT/COULTER CLONE B4-RD1 и CYTO-STAT CD3-FITC/CD56-RD1.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Если проточный цитометр не выровнен и не стандартизирован для флуоресценции или если неправильно выделены популяции клеток, могут быть получены ошибочные результаты.
2. Результаты, полученные с использованием проточного цитометра, систем лизиса или антител, отличных от использованных для определения ожидаемых результатов, могут не попасть в ожидаемый диапазон.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.
2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо третьих лиц, либо непреодолимой силы.
3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ: ООО «Бекмен Культер» 109004, г. Москва, ул. Станиславского, д.21, стр.3
Тел./факс, e-mail: (495) 9846730/(495) 228-67-00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

ИСТОЧНИКИ

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline. 1998. NCCLS document H4-A3.
2. 1997 Revised Guidelines for the Performance of CD4+ T-Cell Determination in Persons with Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. MMWR, January 10, 1997, p.11.

ФОРМЫ ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Клетки IMMUNO-TROL
REF 6607077- 60 тестов (2 x 3 mL, флаконы)

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с локальным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

СВЕДЕНИЯ О ПЕРЕРАБОТКЕ И ИСПРАВЛЕНИИ ИЗДАНИЯ

Редакция LL, 02/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Редакция LM, 07/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- Русский

Редакция LN, 10/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Низкочисленные клетки IMMUNO-TROL

Инструкции по применению

REF **6607098**

Ч.№ 4238098-JN

CE BECKMAN COULTER

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Низкочисленные клетки IMMUNO-TROL – это анализируемый, подверженный лизису продукт контроля качества цельной крови для иммунофенотипического анализа с использованием моноклональных антител и проточной цитометрии. Он обеспечивает положительный клеточный контроль, обрабатываемый так же, как и пробы цельной крови. Это позволяет проверить работу реагента и методы, использованные для метки клеток-мишеней, лизиса эритроцитов и анализа проб с помощью проточной цитометрии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Иммунофенотипический анализ с использованием проточной цитометрии состоит в идентификации и подсчёте клеток-мишеней в пробах цельной крови. Перед проведением анализа проточной цитометрией пробы цельной крови помечаются моноклональными антителами и содержащиеся в них эритроциты лизируются. Положительный клеточный контроль необходим для проверки работы реагентов и методик подготовки проб и отметки.[1,2] Положительный клеточный контроль должен имитировать пробу цельной крови при сравнении работы моноклональных антител, лизиса эритроцитов и анализа проточной цитометрией.

Низкочисленные клетки IMMUNO-TROL являются жидким препаратом стабилизированных человеческих эритроцитов и лейкоцитов (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов), обладающих способностью к лизису, светорассеянию, экспрессии антигенов и связыванию с антителами, соответствующей норме цельной человеческой крови.

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Низкочисленные клетки IMMUNO-TROL содержат два основных клеточных компонента: лейкоциты и эритроциты. Лейкоциты выполняют функцию положительного клеточного контроля низкочисленных клеток IMMUNO-TROL и несут представленные на клетках-мишенях поверхностные антигены, которые связывают моноклональные антитела из реагента. Эритроциты выполняют функцию лизируемого компонента низкочисленных клеток IMMUNO-TROL. Пробы IMMUNO-TROL сначала помечаются моноклональными антителами, а затем лизируются для удаления эритроцитов. Флуоросферы добавляются по необходимости для прямого определения абсолютного количества. Анализ проточной цитометрией окрашенных и лизированных проб IMMUNO-TROL определяет процент и абсолютное количество клеток-мишеней. ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ определяются на утверждённых и стандартизированных проточных цитометрах FC 500, Navios и Navios EX с использованием системы реагентов IMMUNOPREP с рабочей станцией TQ-Prep для лизиса эритроцитов, реагенты с моноклональными антителами COULTER CYTO-STAT для метки поверхностных антигенов лейкоцитов и Flow-Count Fluorospheres для прямого определения абсолютного количества.

РЕАГЕНТ

Низкочисленные клетки IMMUNO-TROL являются жидким препаратом стабилизированных человеческих эритроцитов и лейкоцитов в стабилизирующем растворе, содержащем БСА.

Показания: не применимо.
Противопоказания: не применимо.
Побочные эффекты: не применимо.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Неомицина сульфат <0,1%
Пенициллин G, натриевая соль <0,1%
Phenergan гидрохлорид <0,1%
Может вызывать аллергическую реакцию.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

1. Этот реагент содержит <0,1% азида натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. Во время утилизации соединения азида следует смывать проточной водой. Рекомендуется соблюдение этих предосторожностей для избежания образования отложений в металлических трубах, что может создавать взрывоопасные условия. При попадании в глаза или на кожу, тщательно промойте водой.
2. **ПОТЕНЦИАЛЬНО БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЙ МАТЕРИАЛ**
   Каждая донорская единица, использованная при изготовлении этого материала, была протестирована одобренным FDA методом на наличие антител к вирусам иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и гепатита С (ВГС), а также на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и признана негативной (была повторно нереактивна). Поскольку ни один метод исследования не обеспечивает полной гарантии отсутствия ВИЧ, ВГС, вируса гепатита В (ВГВ) или других инфекционных агентов, работать с реагентом следует в условиях Biosafety Level 2, как рекомендуется в Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 1988 при работе с любыми образцами человеческой сыворотки или крови, потенциально содержащими инфекционные заболевания.
3. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта проб с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не замораживайте реагенты.
5. Избегайте бактериального загрязнения реагентов для предотвращения получения ошибочных результатов.
6. Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этим реагентом.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Не используйте реагент после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.

Невскрытый реагент сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2-8°C. Открытый реагент сохраняет стабильность в течение 90 дней после вскрытия при хранении при температуре 2-8°C. Не замораживать.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Невозможность получения ожидаемых результатов или смещение светорассеяния или параметров флуоресценции могут свидетельствовать о разрушении продукта. Так же необходимо изучить стандартизацию прибора, методику подготовки пробы и реагентов, методику метки антителами и действие антител. Гемолиз может свидетельствовать о неправильных условия хранения, что может повлиять на подверженность продукта лизису.

ПРОЦЕДУРА

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизирован для интенсивности флуоресценции в соответствии с указаниями производителя и лаборатории.
2. Доведите контрольный реагент и антитела до комнатной температуры.
3. Промаркируйте пробирки для антител, которые будут использованы на тестовых пробах.
4. Следуя рекомендуемой процедуре мечения антителами, отмерьте положенный объем антитела в соответственно промаркированную тест-пробирку.
5. Аккуратно вращайте пробирку с контрольным реагентом для перемешивания продукта так же, как при работе с образцом цельной крови.
6. Отмерьте 100 µL контрольного реагента в каждую из тест-пробирок. Аккуратно смешайте, пользуясь вращательной мешалкой.
7. Инкубируйте антитело и контроль, следуя процедуре метки антителами.

ВАЖНО: Если капли реагента остаются у края тест-пробирки, их следует удалить, иначе нелизированные красные кровяные клетки могут загрязнить образец и исказить результаты. Для их удаления можно использовать ватную палочку.

8. Лизируйте помеченный контроль в соответствии с методикой подготовки пробы.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании флуоросфер Flow-Count, перемешайте флакон с флуоросферами Flow-Count на вращательной мешалке и добавьте 100 µL в каждую тест-пробирку, для которой необходим результат в абсолютных значениях.

9. Проанализируйте пробу на проточном цитометре, следуя процедуре анализа для данного реагента с антителами. Искомая популяция указана в ТАБЛИЦЕ ОЖИДАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании флуоросфер Flow-Count подготовленные пробы должны быть проанализированы в течение 2 часов после добавления флуоросфер Flow-Count в соответствующую тест-пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 1. Образец двухпараметрической гистограммы, сравнивающей боковое рассеяние (SS) с рассеянием вперёд (FS) низкочисленных клеток IMMUNO-TROL, лизированных с помощью системы реагентов IMMUNOPREP и рабочей станции TQ-Prep, и анализированных на проточном цитометре Navios.

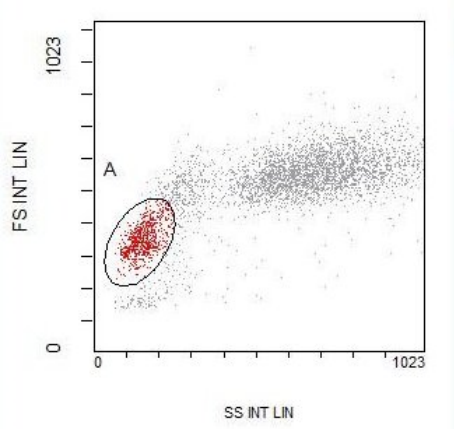


Рисунок 2. Образец двухпараметрической гистограммы соотношения CD45 и бокового рассеяния (SS) низкочисленных клеток IMMUNO-TROL, лизированных с помощью системы реагентов IMMUNOPREP и рабочей станции TQ-Prep, и анализированных с помощью Navios tetra на проточном цитометре Navios.

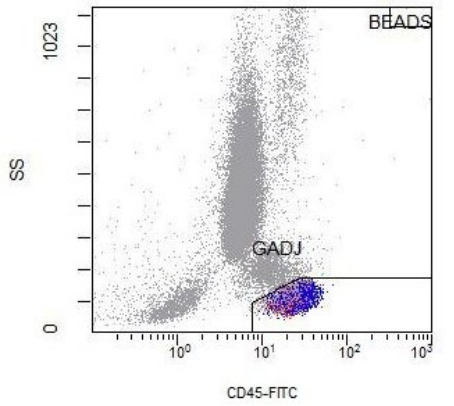
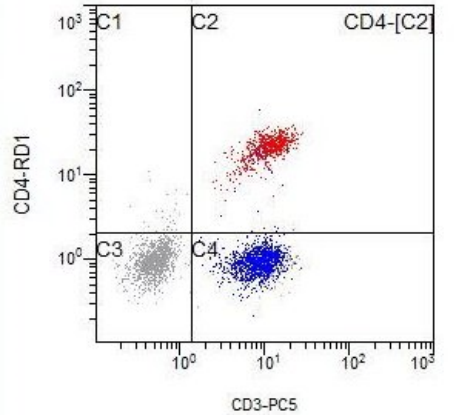


Рисунок 3. Образец двухпараметрической гистограммы соотношения CD3 и CD4 низкочисленных клеток IMMUNO-TROL, помеченных моноклональным антителом CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/CD3-PC5, лизированных с помощью системы реагентов IMMUNOPREP и рабочей станции TQ-Prep, и анализированных с помощью Navios tetra на проточном цитометре Navios.



ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние значения определяются для каждого антигена с использованием проточных цитометрах FC 500, Navios и Navios EX, системы реагентов IMMUNOPREP, рабочей станции TQ-Prep, антител CYTO-STAT, и, при необходимости, флуоросфер Flow-Count. При этих условиях 95% восстановленных значений должны уложиться в рамки установленного диапазона ожидаемых значений. В каждой лаборатории следует установить свои среднее и диапазон ожидаемых значений для каждого анализируемого антигена. Участие в межлабораторной программе обеспечения качества Beckman Coulter (IQAP) предоставляет возможность сравнения своей работы с работой других лабораторий и улучшает лабораторную программу обеспечения качества.

ВАЖНО: Данный контроль нельзя использовать в сочетании со следующими реагентами: CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3 (IgG1)-FITC/ B4-RD1, CYTO-STAT/COULTER CLONE B4-FITC, CYTO-STAT/COULTER CLONE B4-RD1 и CYTO-STAT CD3-FITC/CD56-RD1.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Если проточный цитометр не выровнен и стандартизирован для флуоресценции или если популяции клеток неправильно выделены, могут быть получены ошибочные результаты.
2. Результаты, полученные с использованием проточного цитометра, систем лизиса или антител, отличных от использованных для определения ожидаемых результатов, могут не попасть в ожидаемый диапазон.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.
2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо третьих лиц, либо непреодолимой силы.
3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер» 109004, г. Москва, ул. Станиславского, д.21, стр.3
Тел./факс, e-mail: (495) 9846730/(495) 228-67-00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

ИСТОЧНИКИ

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline. 1998. NCCLS document H4-A3.
2. 1997 Revised Guidelines for the Performance of CD4+ T-Cell Determination in Persons with Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. MMWR, January 10, 1997, p.11.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Низкочисленные клетки IMMUNO-TROL
REF 6607098

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с локальным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

СВЕДЕНИЯ О ПЕРЕРАБОТКЕ И ИСПРАВЛЕНИИ ИЗДАНИЯ

Редакция JL, 02/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Редакция JM, 07/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Редакция JN, 10/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Система реагентов IMMUNOPREP

Реагенты лизиса цельной крови

Инструкции по применению

REF **7546946**
REF **7546999**

Ч.№ 7507950-PH

CE BECKMAN COULTER

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Система реагентов IMMUNOPREP состоит из лабораторных реактивов общего назначения, используемых для подготовки лейкоцитов из цельной крови для иммунофлуоресцентных измерений в оптических проточных цитометрах. Система реагентов IMMUNOPREP (Ч.№ 7546946) предназначена для использования на рабочей станции COULTER Q-PREP, система реагентов IMMUNOPREP (Ч.№ 7546999) предназначена для использования на рабочих станциях COULTER MULTI-Q-PREP, COULTER TQ-Prep и FP 1000.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Возможность классификации белых клеток крови человека в зависимости от экспрессии их поверхностных антигенов обеспечила исследователей важной диагностической и прогностической информацией.[1,2] Исторические методы изоляции лейкоцитов для иммунофлуоресценции включают техники лизирования цельной крови и разделения по градиенту плотности.[3] Подобные коммерчески доступные процедуры требуют промывки пробы для удаления свободных антител и остатков клеток. Повторные повреждения клеток при перемешивания вручную, на вращательной мешалке и центрифугирования могут избирательно повредить злокачественные или "активированные" клетки. Кроме того, может произойти неслучайная потеря клеток за счёт прилипания к контейнеру или их неспособности полностью осесть в процессе центрифугирования.[4] Большинство процедур являются трудоёмкими, требуют точного знания техники и перестают поддаваться обработке при работе с большим количеством проб. В 1987 году была создана система реагентов IMMUNOPREP для быстрой, автоматизированной подготовки цельной крови для иммунофенотипирования и сейчас она широко используется в различных лабораториях, работающих с проточной цитометрией.[5,6]

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Система реагентов IMMUNOPREP является быстрой и мягкой системой лизиса эритроцитов, не требующей промывки и сохраняющей морфологию лейкоцитов и целостность клеточной мембраны.[5] Устранена потеря клеток, связанная с промывкой и центрифугированием. Из-за отсутствия необходимости этих этапов, время проведения анализа существенно сокращается. Автоматизация ещё больше укорачивает время подготовки, обеспечивая возможность быстрой реакции в неотложных клинических ситуациях.

Система реагентов IMMUNOPREP является подобранной системой трёх реагентов, предназначенных для специальной подготовки рабочей станции. Комбинация реагентов состоит из IMMUNOPREP A, агента лизиса эритроцитов, IMMUNOPREP B, лейкоцитарного стабилизатора и IMMUNOPREP C, стабилизатора клеточной мембраны.

РЕАКТИВЫ

Система реагентов IMMUNOPREP Ч.№ 7546946, для использования на рабочей станции COULTER Q-PREP. Система реагентов IMMUNOPREP Ч.№ 7546999, для использования на рабочих станциях COULTER MULTI-Q-PREP, COULTER TQ-Prep и на FP 1000.

Реагенты специально упакованы для соответствия пробы каждой рабочей станции.

Система реагентов IMMUNOPREP для:

Реагенты	Q-PREP	TQ-Prep/ MULTI-Q-PREP/FP 1000
IMMUNOPREP A	65 mL	215 mL
IMMUNOPREP B	32 mL	95 mL
IMMUNOPREP C	14 mL	36 mL

СОСТАВ РЕАКТИВОВ

IMMUNOPREP A
- Муравьиная кислота . . . .1,2 mL/L
- Стабилизатор

IMMUNOPREP B
- Углекислый натрий . . . . . 6,0 g/L
- Хлорид натрия . . . . . 14,5 g/L
- Сульфат натрия . . . . . 31,3 g/L
- Стабилизатор

IMMUNOPREP C
- Параформальдегид. . . . . 10,0 g/L
- Буферы

Показания: не применимо.

Противопоказания: не применимо.

Побочные эффекты: не применимо.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ



ОПАСНО

Муравьиная кислота <1%
Параформальдегид <1%
Вызывает незначительное раздражение кожи.
Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
При вдыхании может вызывать симптомы аллергии или астмы либо затруднение дыхания.
Подозрение на образование рака.
Избегать вдыхания испарений.
Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения/лица.
В случае отсутствия надлежащей вентиляции применять средства защиты органов дыхания.
ПРИ ВДЫХАНИИ: вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить покой в положении, удобном для дыхания.
При появлении раздражения кожи: обратиться за медицинской помощью.
При возникновении респираторных симптомов: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.
Снять загрязненную одежду и постирать перед использованием.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

1. IMMUNOPREP C содержит <1% формальдегид. Избегайте попадания в глаза и на кожу, так как формальдегид может необратимо повредить эти ткани. Не вдыхайте пары. Необходимо использовать защитные очки, чтобы избежать контакта с глазами. Необходимо использовать водостойкие защитные перчатки, такие как латексные или подобные им, чтобы избежать контакта с кожей.
2. С образцами, пробами и всеми материалами, с ними соприкасающимися, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
3. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не используйте реагент после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона или комплекта.
5. Реагенты IMMUNOPREP должны использоваться как единый набор, предоставленный в комплекте для соответствующего прибора.
6. Использование длительности и температуры инкубации, отличных от указанных, может привести к ошибочным результатам.
7. Избегайте бактериального заражения реагентов, так как оно может привести к ошибочным результатам.
8. Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этими реагентами.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА

Подготовки не требуется. Используйте реагенты IMMUNOPREP прямо из флаконов, перемешав аккуратным переворачиванием перед помещением в рабочую станцию.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Хранить при комнатной температуре (15-30°C). Невскрытые флаконы с реагентами сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке комплекта. Открытые флаконы реагентов сохраняют стабильность в течение 30 дней после установки в рабочую станцию.

Реагенты не содержат азидов, способны к биодеградации и не чувствительны к свету. При случайной заморозке, разморозьте полностью при комнатной температуре и аккуратно перемешайте содержимое флаконов перед использованием. Выбрасывайте пустые флаконы из-под реагентов сразу после использования.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

В норме реагенты IMMUNOPREP выглядят как прозрачная жидкость. На разрушение могут указывать любое изменение физических свойств реагентов, значительные колебания значений контрольных показателей или невозможность лизиса красных кровяных клеток нормальной крови; в таком случае реагенты использовать не следует.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

ВНИМАНИЕ: Стабильность проб крови очень изменчива. Для оптимального прохождения лизиса начинайте анализ в течение 6 часов после венепункции. Непомеченная, предохраняемая от свёртывания кровь до начала процедуры должна храниться при температуре 15-30°C. Не охлаждайте.

Заберите венепункцией в асептических условиях пробу венозной крови в пробирку для забора крови, используя соответствующий антикоагулянт (рекомендуется ЭДТА).[7] При использовании вакуумных пробирок для забора анализа, заполняйте их до соответствующего объёма, чтобы гарантировать правильное отношение антикоагулянта к крови (1,5 mg

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

на mL крови). Для каждого теста требуется 100 µL цельной крови. Заберите у каждого пациента достаточно крови для проведения тестов и постановки контроля, и храните аутологичную плазму на случай необходимости разведения пробы. Подсчёт белых кровяных клеток и проверка жизнеспособности клеток должны быть проведены, следуя установленной лабораторной процедуре, для каждого образца венозной крови. Рекомендуемая жизнеспособность клеток – 90%, но её может быть сложно добиться в некоторых аномальных образцах.

ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ ЛЕЙКОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ РЕАГЕНТОВ IMMUNOPREP

ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Система реагентов IMMUNOPREP Ч.№ 7546946, для использования на рабочей станции COULTER Q-PREP

Система реагентов IMMUNOPREP Ч.№ 7546999, для использования на рабочих станциях COULTER MULTI-Q-PREP, COULTER TQ-Prep и на FP 1000

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Рабочая станция COULTER Q-PREP

Рабочая станция COULTER MULTI-Q-PREP

Рабочая станция COULTER TQ-Prep, или

FP 1000

Реагент с моноклональными антителами

CYTO-STAT/COULTER CLONE или его эквивалент

Изотипический контроль или CYTO-STAT/ COULTER CLONE его эквивалент

Разбавитель (при необходимости) аутологичная плазма

тест-пробирки 12 x 75 mm

Пробирки для забора цельной крови с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА)

Пипетки для переноса

Микропипетки

Проточный цитометр

Счётчик клеток или гемацитометр

ПРОЦЕДУРА

1. Для каждой пробы промаркируйте тест-пробирки 12 x 75 mm для испытаний с моноклональными антителами и соответствующего изотипического контроля. За полным описанием реагентов, включающим регулировку подсчёта клеток и периоды инкубации, обращатитесь к соответствующему вкладышу в упаковке.
2. Отмерьте пипеткой 100 µL защищенной от свёртывания цельной крови на дно правильно маркированной тест-пробирки. Удостоверьтесь, что на внутренних стенках и крае пробирки нет следов крови.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подсчёт белых кровяных клеток, выходящий за пределы 3000-10000 клеток/µL может потребовать особой обработки для подгонки концентраций клеток до необходимого уровня. Для разведения рекомендуется использовать аутологичную плазму. За рекомендуемыми концентрациями клеток обратитесь к вкладышу в упаковке реагента с моноклональными антителами.

ВАЖНО: Не разрушенные красные кровяные клетки на крае или стенках пробирки могут загрязнить пробу и исказить результаты. Для удаления остающихся на стенках пробирки капель крови используйте ватную палочку.

3. Добавьте в 12 x 75 mm тест-пробирку 10 µL изотипического контроля, 10 µL моноклональных антител CYTO-STAT/ COULTER CLONE или требуемое количество антител по указаниям на вкладыше в упаковке реагента с моноклональными антителами. Перемешайте на вращательной мешалке.
4. Инкубируйте защищенную от свёртывания цельную кровь с антителом в течение примерно 10 минут при комнатной температуре (15-30°C). За точными инструкциями по инкубации обратитесь к вкладышу в упаковке реагента с моноклональными антителами.
5. До начала процедуры лизиса правильно проведите запуск в соответствии с указаниями производителя. За инструкциями обратитесь к руководству соответствующей рабочей станции. Перейдите к шагу 3 при использовании Q-PREP, шагу 7 при использовании MULTI-Q-PREP, шагу 8 при использовании рабочей станции TQ-Prep или шагу 11 при использовании FP 1000.
6. **ТОЛЬКО ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ Q-PREP:**

ПРИМЕЧАНИЕ: Для анализа проб на проточных цитометрах, измеряющих низкий угол светорассеяния вперёд (FALS), добавьте в пробирки с пробами 0,5 mL деионизированной или дистиллированной воды после удаления их из рабочей станции.

   a. Поместите тест-пробирку в прибор и нажмите кнопку 35 или 90-секундного цикла (CYCLE), в зависимости от использованного метода инкубации. Для запуска цикла закройте дверцу прибора. Перейдите к шагу 9.

7. **ТОЛЬКО ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ MULTI-Q-PREP:**

ПРИМЕЧАНИЕ: Для анализа проб на проточных цитометрах, измеряющих низкий угол светорассеяния вперёд (FALS), тумблер MULTI-Q-PREP должен находится в положении "ON" (верхнее положение) для подачи деионизированной или дистиллированной воды. За деталями обратитесь к руководству по изделию MULTI-Q-PREP.

   a. Загрузите тест-пробирки в съёмное карусельное устройство по часовой стрелке. Поместите карусельное устройство в индексирующее отделение MULTI-Q-PREP. Закройте крышку карусельного устройства.
   b. Для запуска автоматического анализа проб нажмите кнопку RUN. Перейдите к шагу 9.

8. **ТОЛЬКО ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ TQ-Prep:**

ПРИМЕЧАНИЕ: Для анализа проб на проточных цитометрах, измеряющих низкий угол светорассеяния вперёд (FALS), должен отображаться режим 4 реагентов TQ-Prep. За деталями обратитесь к руководству по рабочей станции TQ-Prep.

   a. Загрузите тест-пробирки в съёмное карусельное устройство по часовой стрелке. Поместите карусельное устройство в индексирующее отделение TQ-Prep. Закройте крышку карусельного устройства.
   b. Для запуска автоматического анализа проб нажмите кнопку RUN. Перейдите к шагу 9.

9. Подготовленные пробы можно хранить при комнатной температуре (15-30°C), если анализ проточной цитометрией произойдёт в течение 2 часов. В противном случае накройте пробы и храните их в темноте при 2-8°C. Проанализируйте хранимые пробы в течение 24 часов.
10. Анализируйте подготовленные пробы в проточном цитометре. За инструкциями обратитесь к руководству к проточному цитометру.

11. **ТОЛЬКО ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ FP 1000:**

   a. Загрузите тест-пробирки в съёмное карусельное устройство по часовой стрелке. Поместите карусельное устройство в отделение FP 1000. За деталями обратитесь к руководству по изделию FP 1000.

ВАЖНО Комплект реагентов IMMUNOPREP должен быть смешан из одной партии перед запуском FP 1000. За деталями обратитесь к руководству по изделию FP 1000.

ПРИМЕЧАНИЕ: На проточных цитометрах, измеряющих низкий угол светорассеяния вперёд (FALS), может оказаться необходимым подогнать порог, коэффицент усиления рассеяния вперёд и высокое напряжение бокового рассеяния для выявления трёхчастного перепада.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

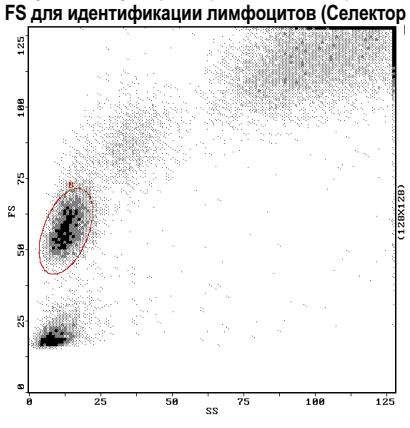
Проверяйте все пробы на лизис эритроцитов, рассматривая пробирки с пробами после обработки и оценивая гистограммы светорассеяния. Нелизировавшиеся пробы выглядят в пробирке мутными. Частично лизировавшиеся пробы будут содержать тяжелые или аномальные лейкоцитарные популяции светорассеяния. В качестве контроля системной проверки вместе с неизвестными пробами обрабатывайте и анализируйте пробу с известными значениями функциональных характеристик.

Для получения оптимальных результатов убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции, и что выставлена компенсация цвета. За инструкциями обратитесь к руководству по изделию проточного цитометра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образцы данных на рисунках 1-4 были получены с использованием защищённой от свёртывания ЭДТА, нормальной пробы цельной крови, реагента с моноклональными антителами CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/ CD3-PC5 и системы реагентов IMMUNOPREP. Пробы анализировались на проточном цитометре EPICS XL-MCL с использованием изотонического раствора COULTER IsoFlow.

Рисунок 1. Двухпараметрическая гистограмма SS к FS для идентификации лимфоцитов (Селектор A).



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 2. Двухпараметрическая гистограмма CD45-FITC к SS для идентификации лимфоцитов (Селектор A).

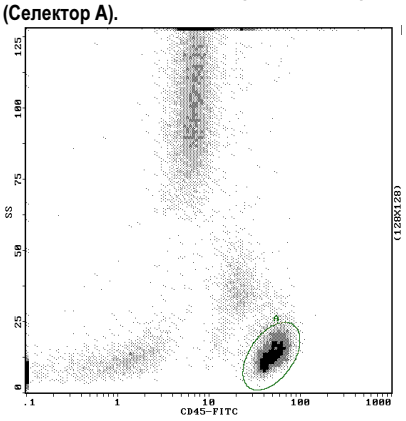


Рисунок 3. Двухпараметрическая гистограмма CD3-FITC к CD4-RD1 с использованием селектора лимфоцитов и Quad Stats, основанных на изотипическом контроле.

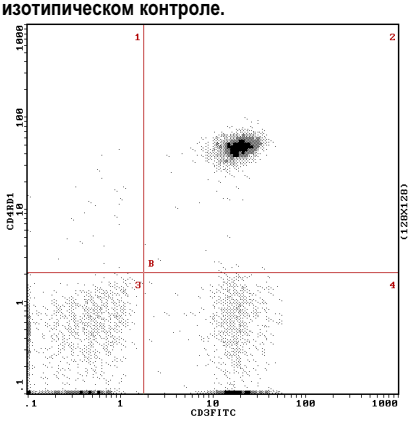
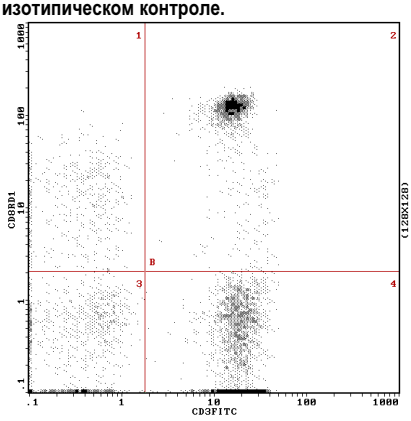


Рисунок 4. Двухпараметрическая гистограмма CD3-FITC к CD8-RD1 с использованием селектора лимфоцитов и Quad Stats, основанных на изотипическом контроле.



ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Реагенты следует использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке комплекта.
2. Данные основываются на нормальных пробах цельной крови.
3. Если проба кажется мутной, лизис не прошёл до конца. Проверяйте правильность подачи и смешивания реагентов рабочей станцией. За процедурой гравиметрической калибровки обратитесь к руководствам по изделию Q-PREP, MULTI-Q-PREP, TQ-Prep или FP 1000.
4. NRBC (ядросодержащие эритроциты) могут не до конца лизироваться и оказаться включёнными в лейкоцитарные популяции светорассеяния.
5. Фактическое число тестов за комплект, которые можно провести в вашей лаборатории, может различаться в зависимости от рабочей нагрузки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Только для пользователей MULTI-Q-PREP; следующие примеры дают предположительные ежедневные сценарии для разных лабораторий.

Сценарий A: Малое использование, 2 пакета в день (прогонка 5 пробирок, затем ещё 5 пробирок по прошествии как минимум 30 минут)

Сценарий B: Малое использование, 1 пакет в день (10 пробирок в одном пакете)

Сценарий C: Значительное использование, 1 комплект в день (прогонка одного комплекта целиком или нескольких комплектов, без пауз)

Таблица 1 отражает среднее число тестов, заполнений и полных тестов на комплект с использованием системы реагентов IMMUNOPREP.

Таблица 1 Использование по сценариям A, B и C

	A	B	C
ТЕСТЫ	269	289	321
ЗАПОЛНЕНИЯ*	52	29	1
ВСЕГО	321	318	322

*Указывает тесты, использованные рабочей станцией MULTI-Q-PREP после включения и после 30 минут простоя между карусельными устройствами. За полной инструкцией по эксплуатации обратитесь к руководству по изделию MULTI-Q-PREP.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.
2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо третьих лиц, либо непреодолимой силы.
3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ: ООО «Бекмен Культер» 109004, г. Москва, ул. Станиславского, д.21, стр.3
Тел./факс, e-mail: (495) 9846730/(495) 228-67-00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

ИСТОЧНИКИ

1. Rose NR and Friedman H, eds. 1980. Manual of clinical immunology, 2d edition. American Society for Microbiology, Washington, DC.
2. Guidelines for prophylaxis against pneumocystis carinii pneumonia for persons infected with human immunodeficiency virus. Center for Disease Control Morbidity and Mortality Weekly Report 38 (S-5):1-9.
3. Mishell BB and Shiigi AM. 1980. Selected methods in cellular immunology. San Francisco: WH Freeman and Co.
4. Caldwell CW and Taylor HM. 1986. A rapid no-wash technique for immunophenotypic analysis by flow cytometry. Am J Clin Path 86(5):600.
5. Barker JW. 1988. An innovative lymphocyte preparation system for flow cytometry. Am Clin Lab 7(7):32.
6. Kotylo PK, Baenzinger JC, Yoder MC, Engle WA and Bolinger CD. 1990. Rapid analysis of lymphocyte subsets in cord blood. Am J Clin Path 93(2):263-266.
7. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Edition (H3). Clinical and Laboratory Standards Institute.

ФОРМА ДОСТАВКИ ПРОДУКТА

Система реагентов IMMUNOPREP REF 7546946
Система реагентов IMMUNOPREP REF 7546999

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с локальным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

СВЕДЕНИЯ О ПЕРЕРАБОТКЕ И ИСПРАВЛЕНИИ ИЗДАНИЯ

Редакция PF, 09/2017

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Редакция PG, 07/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Редакция PH, 10/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Флуоросферы Flow-Count

Инструкции по применению

REF **7547053 — 200 тестов**
REF **A91346 — 200 тестов**

Кат. № 7507992-MJ

CE BECKMAN COULTER

Определение абсолютного количества клеток-мишеней с использованием систем проточной цитометрии Cytomics FC 500, Navios и Navios EX

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Флуоросферы Flow-Count — реагент, содержащий флуоресцентные микросферы для определения процентного содержания и абсолютного числа лимфоцитов и популяций клеток подмножества лимфоцитов в биологических образцов с использованием систем проточной цитометрии Cytomics FC 500, Navios и Navios EX, а также процентов и абсолютного количества популяций клеток CD34+ в биологических образцах с использованием систем проточной цитометрии Cytomics FC 500.

За полной информацией о реагенте, включающей назначение, клиническую значимость и инструкции по сбору, метке и лизису образцов для анализа методом проточной цитометрии обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Общее количество белых клеток крови и процент лимфоцитов обычно получают, используя число лимфоцитов, вычисленное на автоматическом гематологическом приборе, умноженное на процент положительно-окрашенных клеток, вычисленный на проточном цитометре. Однако предполагается, что этот стандартный (непрямой) метод дает значимую вариабельность между различными лабораториями.[1–4] Флуоросферы Flow-Count являются эффективной альтернативой стандартному (непрямому) методу вычисления абсолютного количества клеток-мишеней и сразу дает это значение, используя только проточный цитометрический иммунофенотипический анализ. При смешении идентичных объемов биологического образца и флуоросфер Flow-Count можно установить отношение числа клеток в образце к числу флуоросфер. Затем клетки-мишени и флуоросферы подсчитываются на Cytomics FC 500, Navios или Navios EX или эквивалентных системах проточной цитометрии. Так как концентрация флуоросфер известна, абсолютное количество клеток-мишеней можно определить по следующей формуле:

$$\text{Абсолютное количество (клетки/µL)} = \frac{\text{Общее число подсчитанных клеток}}{\text{Общее число подсчитанных флуоросфер}} \times \text{Флуоросферы Flow-Count Аналитическая концентрация}$$

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

В основе прямого метода Flow-Count лежит смешивание пробы флуоросфер Flow-Count известного объема (100 мкл) и концентрации с равным объемом биологического образца. Образец подготавливается в соответствии с указаниями на соответствующем вкладыше в упаковке. Затем к подготовленной пробе добавляются флуоросферы Flow-Count. После анализа на проточном цитометре можно самостоятельно или автоматически с помощью программного обеспечения прибора вычислить абсолютное количество клеток-мишеней, используя аналитическую концентрацию.

СОСТАВ РЕАКТИВОВ

Флуоросферы Flow-Count состоят из полистироловых флуоросфер величиной 10 мкм (номинальный диаметр) в среде для водной суспензии, содержащей сурфактант и 1% формальдегид. Каждая флуоросфера содержит краситель, который светоизлучает на длине от 525 нм до 700 нм при возбуждении волной длины 488 нм. Аналитическая концентрация флуоросфер Flow-Count получена по результатам многочисленных повторных анализов на анализаторе размеров частиц COULTER.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА

Подготовки не требуется. Флуоросферы Flow-Count не разводят и используют прямо из флакона. Следует удалить весь алюминий от термосваренного покрытия с верха флакона. Перед пипетированием из флакона необходимо перемешать его содержимое (от 10 до 12 секунд на вихревом смесителе).

Показания: не применимо.

Противопоказания: не применимо.

Побочные эффекты: не применимо.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ



ОПАСНО
Формальдегид <3%
Вызывает раздражение кожи.
Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
Вызывает тяжелое раздражение глаз.
Подозрение на образование генетических дефектов.
Может вызвать рак.
Получить специальные инструкции перед использованием.
Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения/лица.
При воздействии или подозрении на таковое: обратиться за медицинской помощью;
снять загрязненную одежду и постирать перед использованием.
SDS Паспорт безопасности доступен на веб-сайте ***beckman.com/techdocs***.

1. Этот реагент содержит 1% формальдегид. Избегайте попадания в глаза и на кожу, так как формальдегид может необратимо повредить эти ткани. Не вдыхайте пары. Пользуйтесь соответствующей защитой, такой как перчатки и защита для глаз.
2. Флуоросферы Flow-Count используются прямо из флакона. Не разводите на аликвоты и не замораживайте флуоросферы Flow-Count так как это может привести к ошибочным результатам.
3. Следует удалить весь алюминий от термосваренного покрытия с верха флакона. Остатки алюминия могут прореагировать с формальдегидом и вызвать изменение в проявлении флуоросфер Flow-Count.
4. Открытые флаконы с флуоросферами Flow-Count следует хранить в вертикальном положении во избежание утечки.
5. С образцами, пробами и всеми материалами, с ними соприкасающимися, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
6. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта образцов и проб с кожей и слизистыми оболочками.
7. Не используйте флуоросферы Flow-Count после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.
8. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, используйте откалиброванную пипетку с позитивным вытеснением или пипетку повтора для подачи биологических образцов и флуоросфер Flow-Count.
9. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, для точного и аккуратного пипетирования образца и флуоросфер Flow-Count пользуйтесь техниками пипетирования, рекомендованными изготовителем пипетки.
10. Флуоросферы Flow-Count за долгий период хранения могут осесть. Перед использованием убедитесь, что флуоросферы полностью ресуспензированы. Избегайте чрезмерного перемешивания для минимизации возможности возникновения пузырьков воздуха. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, не пипетируйте пузыри воздуха.
11. Инкубация или перемешивание в течение времени и при температурах, отличных от указанных, могут привести к искажению результатов.
12. Подготовленные пробы следует анализировать на проточном цитометре в пределах 2 или менее часов (см. вкладыши в упаковке соответствующих продуктов) после добавления флуоросфер Flow-Count.
13. Каждая партия флуоросфер Flow-Count имеет определенную концентрацию флуоросфер. При определении абсолютного количества клеток-мишеней убедитесь, что используете правильную аналитическую концентрацию.
14. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, убедитесь в том, что сосчитаны по крайней мере 1 000 флуоросфер Flow-Count.
15. При хранении или использовании не оставляйте флуоросферы Flow-Count под ярким светом.
16. Избегайте бактериального заражения флуоросфер Flow-Count, так как оно может привести к ошибочным результатам.
17. Избегайте испарения и утечек флуоросфер Flow-Count и проб, так как это может привести к ошибочным результатам.
18. Не следует использовать включающие в себя промывку методы подготовки, так как это приводит к неопределимым потерям клеток.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

ВАЖНО! Открытые флаконы с флуоросферами Flow-Count следует хранить в вертикальном положении во избежание утечки.

Флуоросферы Flow-Count стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 2–8°C. Открытые флаконы флуоросфер Flow-Count стабильны в течение 30 дней при хранении при температуре 2–8°C в отсутствие света. Избегайте замораживания и воздействия света. Перед использованием доведите флуоросферы Flow-Count до 20–25°C.

Подготовленные пробы после добавления флуоросфер Flow-Count сохраняют стабильность до 2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

или менее часов, в соответствии с указаниями на вкладыше в упаковке выбранного вами приложения.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любое внешнее изменение флуоросфер Flow-Count во взвеси (в норме это мутная бесцветная жидкость) или появление вторичных флуоресцирующих популяций, составляющих более 20% всей популяции, могут указывать на разрушение реагента, и в таком случае его не следует использовать.

ЗАБОР ОБРАЗЦА И ПОДГОТОВКА

За конкретными указаниями по обращению с каждым тестируемым приложением обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Флуоросферы Flow-Count
REF 7547053 — 200 тестов (1 x 20 мл)
REF A91346 — 200 тестов (1 x 21 мл)

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Биологическая проба, помеченная нужным антителом и лизированная с помощью системы реагентов COULTER IMMUNOPREP, или

Биологическая проба, меченная реагентами Stem-Kit и лизированная в приготовленном 10X NH_4Cl Lysing Solution (Лизирующий раствор)

Пипетка-репитер (100 мкл) и наконечники, или

Пипетка с позитивным вытеснением (100 µL) и наконечники

Таймер

Вихревой смеситель

Системы проточной цитометрии Cytomics FC 500, Navios и Navios EX

ПРОЦЕДУРА флуоросфер Flow-Count

1. Приготовьте тестовую пробирку с подготовленной пробой.

ВАЖНО! Для получения оптимальных результатов при добавлении 100 мкл биологического образца или 100 мкл флуоросфер Flow-Count в тестовую пробирку необходимо соблюдать точную и прецизионную технику пипетирования. Обратитесь к инструкциям по пипетированию от изготовителя и нижеприведенной ПРОЦЕДУРЕ ПРОВЕРКИ ТЕХНИКИ ПИПЕТИРОВАНИЯ.

2. Смешивайте флуоросферы Flow-Count на вихревом смесителе от 10 до 12 секунд. Избегайте избыточного смешивания для минимизации возможности появления пузырей воздуха.
3. Добавьте 100 мкл флуоросфер Flow-Count в тестовую пробирку. Не пипетируйте пузыри воздуха.
4. Смешивайте содержимое тестовой пробирки на вихревом смесителе на 50% от высоты пробирки в течение 5 секунд. Повторите смешивание на вихревом смесителе прямо перед анализом методом проточной цитометрии.
5. Повторите шаги с 1 по 4 для каждой пробы, в которой определяете абсолютное количество клеток-мишеней.

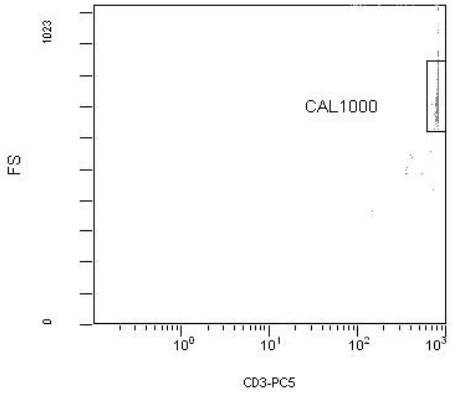
ВАЖНО! Подготовленные пробы следует анализировать на проточном цитометре в пределах 2 или менее часов после добавления флуоросфер Flow-Count. Для некоторых приложений максимальное время простоя пробы перед анализом после добавления флуоросфер Flow-Count может быть меньшим. За этой информацией обратитесь к вкладышам в упаковке соответствующих продуктов.

АНАЛИЗ ПРОБ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

За информацией о соответствующих инструкциях по анализу проб для каждого приложения обращайтесь к вкладышам в упаковке соответствующих продуктов.

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции, и что выставлена компенсация цвета. За инструкцией обратитесь к руководству по изделию соответствующего прибора.
2. Создайте гистограммы, следуя указаниям на вкладыше в упаковке соответствующего продукта.
3. Создайте дополнительную двухпараметрическую гистограмму FL4 LOG (или FL3 LOG или FL2 LOG или FL1 LOG) к FS или ВРЕМЕНИ (см. Рисунок 1). Нарисуйте прямолинейный (или эквивалентный) селектор вокруг флуоросфер Flow-Count (правый верхний угол) и обозначьте его как CAL.
4. Введите аналитическую концентрацию флуоросфер Flow-Count, которая указана на листе данных анализа, приложенном к этому вкладышу в упаковке. За информацией о введении аналитической концентрации или фактора CAL обратитесь к соответствующим руководствам по приборам.

Рисунок 1: Ниже представлена типичная гистограмма флуоросфер Flow-Count, проанализированных на проточном цитометре Cytomics FC 500.



ВАЖНО! Убедитесь, что область CAL полностью охватывает основную популяцию флуоросфер Flow-Count (синглеты), но исключает дуплеты (точки с очень высоким прямым рассеянием) и что использована правильная аналитическая концентрация.

5. Перемешивайте содержимое тестовой пробирки на вихревом смесителе на 50% от высоты пробирки в течение 5 секунд.
6. Анализируйте тестовые пробирки в проточном цитометре.

ВАЖНО! Убедитесь в том, что сосчитаны по крайней мере 1 000 флуоросфер Flow-Count.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕРКИ ТЕХНИКИ ПИПЕТИРОВАНИЯ

Оптимальные результаты получаются при точном и аккуратном пипетировании и образца, и флуоросфер Flow-Count. Чтобы проверить, является техника пипетирования, использованная для подачи образца и флуоросфер Flow-Count, точной, следуйте описанной ниже процедуре проверки.

1. Поместите тестовую пробирку и сосуд для уравновешивания на аналитические весы.
2. Настройте значение весов на нуль.
3. Следуя инструкции по пипетированию изготовителя пипетки, пипетируйте 100 мкл образца или флуоросфер Flow-Count в тестовую пробирку.
4. Запишите вес тестовой пробирки, сосуда для уравновешивания и дозированного образца или пробы флуоросфер Flow-Count.
5. Настройте значение весов на нуль.
6. Повторяйте шаги с 3 по 5, пока не взвесите по крайней мере 10 образцов или проб флуоросфер Flow-Count.
7. Вычислите среднее, стандартное отклонение (±1 SD) и коэффициент вариации (% CV) взвешиваний.
8. % CV должен быть ≤2,0%.

АБСОЛЮТНЫЙ ПОДСЧЕТ

Чтобы определить абсолютное количество клеток-мишеней на проточных цитометрах Beckman Coulter, введите аналитическую концентрацию флуоросфер Flow-Count при обозначении области CAL в соответствии с инструкцией в шаге 3 под заголовком **АНАЛИЗ ПРОБ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**. После того, как сосчитаны по крайней мере 1 000 флуоросфер, абсолютное количество клеток-мишеней автоматически вычисляется по следующей формуле:

$$\text{Абсолютное количество (клетки/мкл)} = \frac{\text{Общее число подсчитанных клеток}}{\text{Общее число подсчитанных флуоросфер}} \times \text{Флуоросферы Flow-Count Аналитическая концентрация}$$

Если образец был разведён, результат приведённого выше уравнения следует скорректировать в соответствии с коэффицентом разбавления.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для достижения оптимальных результатов, убедитесь в том, что пипетки откалиброваны в соответствии с частотой, рекомендованной производителем. Для получения оптимальных результатов убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции, и что выставлена компенсация цвета.

За инструкцией обратитесь к руководству по изделию соответствующего прибора.

За процедурой контроля качества реагентов обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Эта лизирующая система может применяться только с системой реагентов IMMUNOPREP или 10X NH_4Cl Lysing Solution (Лизирующий раствор) (только в наборе реагентов Stem-Kit) при использовании флуоросфер Flow-Count. Флуоросферы Flow-Count нельзя использовать в сочетании с другими методами лизиса.
2. Добавление органических растворителей или растворов с высокой ионной силой может вызвать необратимые разбухание или агрегацию флуоросфер Flow-Count.
3. Подготовленные пробы нужно анализировать на проточном цитометре в пределах 2 часов после добавления флуоросфер Flow-Count.
4. За информацией о других приборных ограничениях обратитесь к руководствам по изделию проточного цитометра.
5. За информацией о прочих ограничениях реагента обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА
За информацией о надежности метода обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

ЛИНЕЙНОСТЬ
За информацией о линейности метода обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

ТОЧНОСТЬ
За информацией о точности метода обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА
1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.
2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо третьих лиц, либо непреодолимой силы.
3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер» 109004, г. Москва, ул. Станиславского, д.21, стр.3
Тел./факс, e-mail: (495) 9846730/(495) 228-67-00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

ИЗБРАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Rumke CL. 1995. The imprecision of the ratio of two percentages observed in differential white blood cell counts: A warning. Blood Cells 11:137-140.
2. Rumke CL. 1995. Imprecision of the ratio-derived differential leukocyte counts. Blood Cells 11:311-314.
3. Koepke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.
4. Malone JL, Simms TE, Gray GC, Wagner KF, Burge JR and Burke DS. 1990. Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus Type 1-infected patients: Total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. J AIDS 3:144-151.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА
Флуоросферы Flow-Count
REF 7547053 — 200 тестов (1 x 20 мл)
REF A91346 — 200 тестов (1 x 21 мл)

За дополнительной информацией или при получении поврежденной продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь с местным представителем компании Beckman Coulter.

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (PN C05838).

Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

По вопросам качества продукции обращаться к представителю производителя на территории РФ:
ООО «Бекмен Культер»,
109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел.: +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Тел.: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

СВЕДЕНИЯ О ПЕРЕРАБОТКЕ И ИСПРАВЛЕНИИ ИЗДАНИЯ

Редакция MG, 09/2017

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки

Редакция MH, 07/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Редакция MJ, 12/2018

Изменения были внесены в:
- Добавить новые языки
- Удалено (COULTER EPICS XL/XL-MCL)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru