

Сравнительное исследование чувствительности методов проточной цитофлюорометрии и иммуномагнитной сепарации лимфоцитов в клинической иммунологии

Т.К. Давтян, С.А. Аветисян, Д.А. Погосян

Клинический центр "Арменикум", кафедра патофизиологии ЕрГМУ им. М. Герац

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: Т-лимфоциты, проточная цитофлюорометрия, иммуномагнитная сепарация

Изучение функциональной активности и абсолютного количества популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток является основным методическим подходом для диагностики, прогнозирования и мониторинга эффективности фармакотерапии при первичных и вторичных иммунодефицитах, аутоиммунных и аллергических заболеваниях, ВИЧ-инфекции и СПИДе [1,7]. Валидным методом исследования иммунокомпетентных клеток по поверхностным маркерным антигенам или кластерным детерминантам (CD) является проточная цитофлюорометрия [4, 5]. Однако этот метод является довольно дорогостоящим, и поэтому в качестве альтернативы был предложен метод иммуномагнитной сепарации клеток в сочетании с иммуноферментным анализом (ИФА), который не требует дорогостоящего оборудования.

Оба метода основаны на использовании меченых моноклональных антител, связывающихся со специфическими для данной популяции или субпопуляции иммунокомпетентных клеток поверхностными рецепторами. При проточной цитофлюорометрии в качестве маркера используются флюорохромы, а в ИФА – фермент пероксидаза. Флюорохромы при возбуждении лазерным лучом с определенной длиной волны испускают характерное световое излучение, а пероксидаза вызывает цветное окрашивание раствора субстрата. Измерения вышеуказанных показателей дают информацию о количестве соответствующих клеток в крови. При проточной цитофлюорометрии сначала производится подсчет абсолютного количества лейкоцитов и лимфоцитов с помощью автоматического гематологического анализатора и лишь затем – собственно цитофлюорометрия.

По данным авторов метода ИФА, нижний предел чувствительности для $CD4^+$ Т-клеток составляет 14 клеток/мкл, а для $CD8^+$ Т-клеток – 15 клеток/мкл. При этом наблюдается высокая корреляция ($r^2 = 0,95$ для $CD4$ и $r^2 = 0,81$ для $CD8$) между данными этого метода и метода проточной цитофлюорометрии [3], то

есть данные этих двух методов сопоставимы. Однако в ходе клинических испытаний препарата Арменикум были выявлены существенные расхождения в данных, полученных с применением этих методов.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение двух методов, применяющихся для измерения содержания иммунокомпетентных клеток: проточной цитофлюорометрии в сочетании с автоматическим гематологическим анализом крови и иммуномагнитной сепарации клеток с последующим иммуноферментным анализом. Также исследованы некоторые причины расхождения данных, полученных с помощью методов ИФА и проточной цитофлюорометрии.

Материал и методы

Пациенты. В исследование были включены 150 ВИЧ-инфицированных из 13 стран: мужчины – 79%, женщины – 21%. Подавляющее большинство больных (80%) вошли в возрастную группу от 21 до 40 лет. Удельный вес больных в стадии СПИДа составил 27%. Для определения содержания $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов брали венозную кровь в объеме 4 мл в пробирки, содержащие КЗ ЭДТА (Vacuette, Greiner).

Гематологические исследования цельной венозной крови. Абсолютные и относительные гематологические показатели крови определяли автоматически с использованием счетчика клеток Nysel (Celly, Франция). Электронный метод подсчета клеток основан на измерении электропроводимости суспензии клеток крови в буферном растворе. Гематологический анализатор дифференцирует популяции белых клеток крови, согласно их размерам в условиях лизиса. Лимфоциты после лизиса коррелируют с клетками, занимающими на гистограмме WBC регион от 30 до 100 фл (фемтолитр – 10^{-15} л). Клетки среднего размера (моноциты, базофилы, эозинофилы) располагаются на гистограмме в регионе от 100 ± 5 до 155 ± 1 фл. Нейтро-

фильные гранулоциты после лизиса коррелируют с клетками, расположенными на гистограмме между 155 ± 10 и > 440 фл.

Проточная цитофлуориметрия клеток. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson), состоящем из жидкостной

системы, оптической части, электронного блока, охлаждаемого воздухом аргонно-ионного лазера, генерирующего синее излучение с длиной волны 488 нм, мощностью 15 Вт и компьютерного модуля. Оптическая схема прибора представлена на рис. 1.

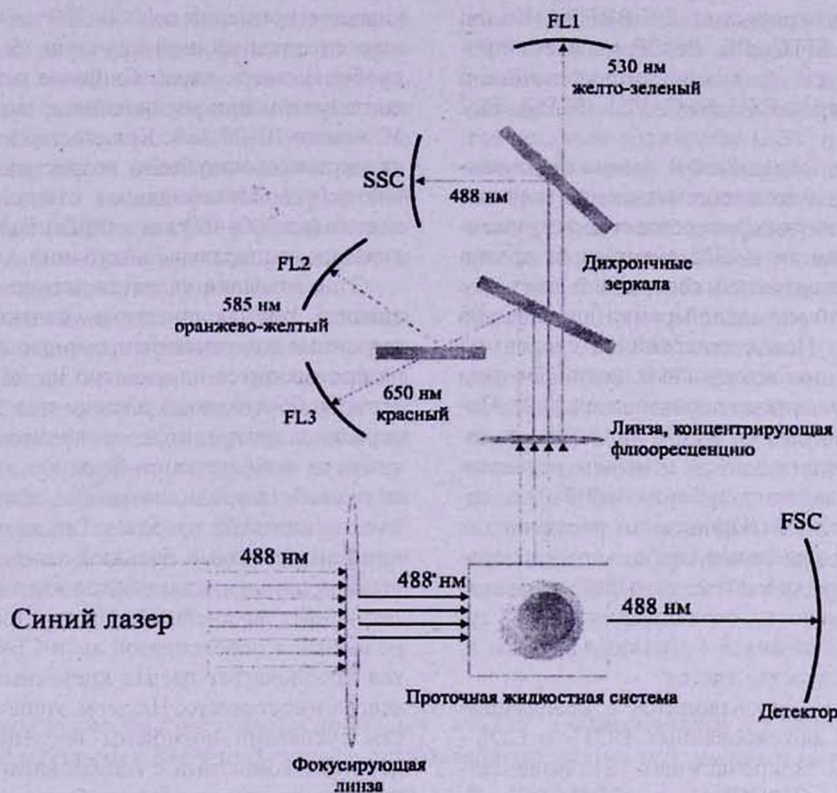


Рис. 1. Оптическая схема проточного цитофлуориметра

Сущность метода заключается в следующем: сначала производится иммунофенотипирование клеток – обработка моноклональными антителами, меченными различными флуоресцентными красителями (флуорохромами). В качестве флуорохромов в настоящее время широко используются флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE), хлорофильный белок перидинин (PerCP) и др., которые при возбуждении лазерным лучом с длиной волны 488 нм излучают соответственно зеленый, оранжевый и красный свет [6,8]. При обработке клеток смесью моноклональных антител, специфичных к CD4, CD8, CD19 и CD16+56 использовали наборы двухцветового (FITC/PE) и/или трехцветового (FITC/PE/PerCP) окрашивания клеток в соответствии с инструкциями фирмы-производителя (Becton Dickinson). После обработки клеток мечеными антителами производится лизис эритроцитов, а затем – анализ клеток в фокусированном пучке лазерного излучения, где каждый флуорохром испускает характерное световое излучение. Оп-

тические сигналы преобразуются в электрические, передаются в компьютерный модуль, где и производится сбор и обработка информации. Клеточная взвесь при анализе распыляется на микрокапли, содержащие по единичной клетке. Таким образом, каждая клетка анализируется отдельно, что позволяет не только избежать появления артефактов, но и определить уровень экспрессии соответствующего рецептора на поверхности клетки.

Существуют две различные методики обработки клеток цельной крови моноклональными антителами, меченными различными флуорохромами для их последующего анализа на проточном цитофлуориметре. Первый метод – лизис с отмывкой, предполагает добавление смеси моноклональных антител в цельную кровь, инкубацию, после чего производится лизис эритроцитов и двукратная отмывка буферным раствором. Второй метод – лизис без отмывки исключает стадию отмывки клеток крови и дает возможность проанализировать клетки сразу после лизиса эритро-

цитов. Таким образом, в зависимости от конкретных задач, анализ можно проводить с использованием как цельной периферической крови, так и только мононуклеарной фракции клеток.

Калибровка аппарата производится автоматически, отдельно для каждого из двух типов обработки клеток антителами, с помощью смеси нефлюоресцирующих и флюоресцирующих микрочастиц CaliBRITE (Becton Dickinson), меченых FITC, PE, PerCP и пакета программы FACSComp для детекции, амплификации и компенсации параметров FSC, SSC, FL1 (FITC), FL2 (PE) и FL3 (PerCP).

Иммуномагнитная сепарация и иммуноферментный анализ. Сущность метода состоит в смешивании с цельной кровью магнитных микрочастиц, нагруженных моноклональными анти-CD2 антителами против пула Т-клеток с последующей сепарацией клеток с помощью специальной магнитной рамки для стрипов 96-луночной плашки. После сепарации в суспензию клеток добавляются моноклональные анти-CD4 или анти-CD8 антитела, меченные пероксидазой [2,9]. После того, как они свяжутся со своей мишенью на поверхности клетки, производится отмывка несвязавшихся антител и добавляется субстратный буфер, содержащий H_2O_2 и хромоген. Происходит расщепление H_2O_2 пероксидазой и выделение свободного кислорода, который окисляет хромоген, вызывая цветовую реакцию. По интенсивности окрашивания можно судить о количестве связавшихся с клетками антител и, соответственно, о количестве клеток.

Калибровка системы производится с использованием стандартов – фиксированных $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток на магнитных микрочастицах [2]. Количественное определение $CD2^+CD4^+$ и $CD2^+CD8^+$ Т-лимфоцитов проводили в цельной крови (в течение 6 часов после забора) с использованием тест-системы Carcella® $CD4/CD8$, Whole Blood/Sang total по рекомендации фирмы-производителя Sanofi Pasteur (Франция). Также использовались магнитные шарики Dynabeads® M-450 Pan-T ($CD2$) производства фирмы Dynal. Диаметр магнитных частиц этих двух наборов составляет 0,5–0,8 и 4,5 мкм соответственно.

Количество $CD2^+CD4^+$ и $CD2^+CD8^+$ Т-лимфоцитов определялось по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных, фиксированных на парамагнитных шариках $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток.

Результаты и обсуждение

Определение абсолютного количества $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток методом иммуноферментного анализа. Нами проведены исследования для определения количества $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток у 110 больных с ВИЧ-инфекцией в динамике лечения препаратом Арменикум. Результаты проведенных исследований по-

зволили нам выявить некоторые причины получения несопоставимых и невоспроизводимых данных.

Смешивание периферической крови с магнитными частицами и время инкубации являются весьма критическими для воспроизводимости результатов. При инкубации смеси на шейкере (частота колебаний 50–450 об/мин) количество $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток увеличивается примерно на 200–300 клеток/мкл по сравнению со смешиванием вручную (5 раз переворачивая пробирку вверх-вниз). Сходные результаты нами были получены при увеличении времени инкубации с 5–10 мин до 10–25 мин. Количество клеток при увеличении времени инкубации возрастало в среднем на 100 клеток/мкл. Максимальное отклонение в количестве клеток (на 300–400 клеток/мкл) наблюдалось при увеличении температуры инкубации.

Этап отмывки является весьма важным моментом анализа, так как при этом удаляются все клетки, не связанные с парамагнитными шариками. Эта процедура производится однократно на магнитной рамке для стрипов 96-луночной плашки и, в зависимости от содержания эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, а также от концентрации белков и липидов, реологических свойств крови, возможно возникновение различных технических проблем. Так, при высоком содержании эритроцитов и большой концентрации белков на стенках лунок скапливаются клеточные агрегаты, что затрудняет дальнейший анализ. Добавление конъюгированных с пероксидазой анти- $CD4$ и анти- $CD8$ антител предполагает распад клеточных агрегатов, что не всегда имеет место. На этом этапе из-за неомогенности суспензии возможны неспецифические взаимодействия конъюгата с мембранами и белками, остающимися на стенках лунок. Этим и объясняется получение ложно увеличенных данных для $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, так как процедура отмывки не является эффективной и производится однократно.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что на первом же этапе анализа по крайней мере три фактора существенно влияют на конечный результат. Увеличение количества анализируемых клеток под влиянием температуры, времени инкубации и интенсивности перемешивания реагентов, по-видимому, связано с неспецифическим захватом магнитных шариков фагоцитирующими клетками, которые присутствуют в цельной крови (нейтрофилы, моноциты). Для выявления фагоцитоза магнитных частиц клетками в ходе анализа мы проводили эксперимент с использованием анти- $CD2$ магнитных шариков диаметром 0,5–0,8 и 4,5 мкм. При смешивании магнитных шариков с клетками в соотношении 20:1, нами было обнаружено, что более крупные шарики связывали в 2–3 раза меньше клеток, чем мелкие. Естественно предположить, что крупные шарики не могут быть фагоцитированы и, следовательно, будут связываться именно с клетками, реально экс-

прессирующими CD2 антиген, в то время как мелкие частицы вполне могут фагоцитироваться и неспецифическим образом связываться с другими, не экспрессирующими CD2 антиген клетками.

Повышенные данные о содержании CD4⁺ Т-клеток, полученные методом ИФА, по-видимому, являются следствием неспецифического взаимодействия моноклональных анти-CD4 антител с популяцией CD4⁺ моноцитов/макрофагов и/или фагоцитоза парамитных шариков этими клетками, а также присутствия адгезирующих пластин моноцитов вследствие неполноценной отмывки лунок. Различия количества CD8⁺ Т-клеток между двумя методами анализа также, по-видимому, связаны с неспецифической реакцией моноклональных анти-CD8 антител с дендритными клетками при ИФА и вариативностью исходного и остаточного количества клеток в лунках плашки.

Еще одной причиной ненадежности ИФА является различный уровень экспрессии рецепторов на поверхности клеток у разных доноров. Так как конечный эффект при ИФА (цветовое окрашивание) зависит от количества связавшихся с клетками моноклональных антител, то есть от суммарного количества рецепторов, с которыми они связываются, то при одинаковом количестве исследуемых клеток те образцы, в которых экспрессия рецептора выше, будут давать более интенсивное окрашивание. В то же время этот фактор

не имеет значения при проточной цитофлуориметрии, так как там каждая клетка анализируется отдельно. Возможно, что именно этим объясняется тот факт, что добавление в кровь различных фармакологических препаратов в терапевтических концентрациях также сильно влияет на количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток при ИФА. Так, в присутствии Арменикума наблюдается подавление взаимодействия конъюгатов с CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, а в присутствии доксорубина, наоборот, – усиление. Следовательно, в присутствии определенных концентраций лекарственных препаратов реальное количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток определить по методу ИФА невозможно.

Сравнительный анализ данных, полученных с помощью проточной цитофлуориметрии и ИФА, позволил выявить тот диапазон содержания клеток, в котором результаты обоих методов достаточно близки. Данные в основном совпадают при содержании CD4⁺ Т-клеток 350–550 клеток/мкл ($r^2=0.8$), тогда как при содержании CD4⁺ Т-клеток меньше 220 и больше 600 наблюдаются существенные различия. Данные о количестве CD8⁺ Т-клеток существенно различаются во всем диапазоне содержания клеток у исследованных доноров. При этом количество CD4⁺ клеток при использовании метода ИФА было повышено по сравнению с данными проточной цитофлуориметрии, а количество CD8⁺ клеток – в основном понижено (табл.).

Таблица

Сравнительное исследование содержания CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в 1 мкл крови здоровых доноров и больных ВИЧ-инфекцией, определенного тремя различными методами

Группы исследования		Абсолютное содержание CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т-клеток в 1 мкл крови					
		ИФА		Двухцветная цитофлуориметрия		Трехцветная цитофлуориметрия	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
Здоровые доноры		961±27.6 n=18 $r_1^2=0.71$	871±192 n=18 $r_1^2=0.32$	895±67 n=18 $r_2^2=0.96$	634±49 n=18 $r_2^2=0.96$	829±59 n=18	627±34 n=18
Больные ВИЧ-инфекцией	Стадия А	599±44 n=34 $r_1^2=0.76$	619±47 n=34 $r_1^2=0.4$	559±83 n=32 $r_2^2=0.96$	562±80 n=32 $r_2^2=0.91$	528±89 n=34	535±76 n=34
	Стадия В	536±32 n=89 $r_1^2=0.36$	617±59 n=89 $r_1^2=0.29$	438±34 n=75 $r_2^2=0.97$	1103±86 n=75 $r_2^2=0.98$	412±27 n=80	1090±100 n=80
	Стадия С	367±59 n=25 $r_1^2=0.33$	488±62 n=25 $r_1^2=0.53$	190±82 n=22 $r_2^2=0.94$	588±101 n=22 $r_2^2=0.93$	174±72 n=21	567±97 n=21

r_1^2 – корреляция между ИФА и двухцветной проточной цитофлуориметрией,

r_2^2 – корреляция между двух- и трехцветной проточной цитофлуориметрией

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать заключение о том, что определение абсолютного количества $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов методами иммуномагнитной сепарации в сочетании с ИФА является невалидным, невоспроизводимым методом, весьма чувствительным к техническим условиям проведения анализа, гематологическим показателям крови и присутствию фармакологических препаратов.

Проточная цитофлюорометрия популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток. Для цитофлюорометрического определения абсолютного и относительного содержания популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток необходимым условием является комбинированное использование двух независимых приборов: гематологического анализатора и проточного цитофлюорометра. При этом абсолютное количество лимфоцитов и/или их процентное содержание вместе с количеством лейкоцитов, получен-

ное с помощью гематологического анализатора, вводится в соответствующую программу проточного цитофлюорометра для автоматического подсчета абсолютного и относительного количества популяций иммуноцитов.

В проточной цитофлюорометрии весьма существенную роль играет обработка клеток мечеными моноклональными антителами. В принципе количество отдельных популяций можно проанализировать с помощью монофлюорохромного окрашивания клеток (например, FL1-FITC), а потом по гистограммам «количество клеток/интенсивность флуоресценции» и/или по дот-плотам «FL1-FITC/FSC» или «SSC/FL1-FITC», определить количество клеток. Однако в данном случае точность, воспроизводимость и чувствительность анализа будут приближаться к таковым при использовании метода иммуномагнитной сепарации клеток в сочетании с ИФА.

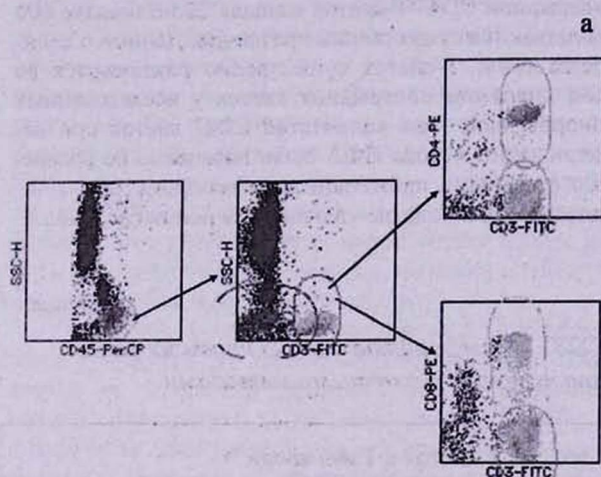
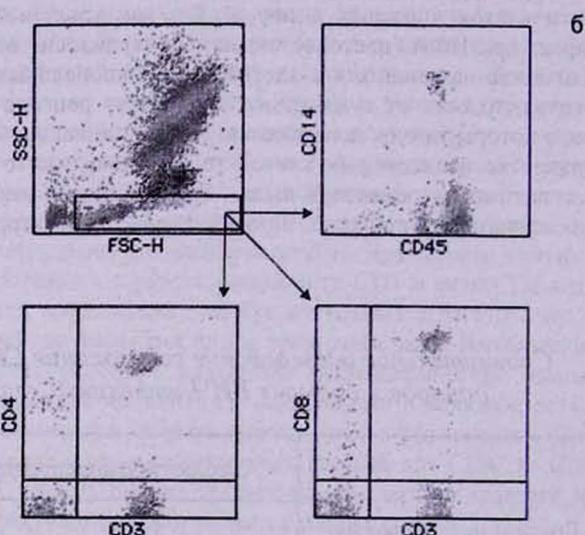


Рис.2. а – проточная цитофлюорометрия с дифлюорохромным окрашиванием клеток. В первом дот-плоте «FSC-H/SSC-H» выбирается регион, содержащий мононуклеарные клетки, а для исключения популяции моноцитов производится автоматическая корректировка по дот-плоту «CD45/CD14». Выбранный участок анализируется с использованием флюорохромных пар CD3/CD4 и CD3/CD8 для определения количества клеток в различных субпопуляциях Т-лимфоцитов;

Второй метод – дифлюорохромная обработка клеток – предполагает использование двух каналов флуоресцентных сигналов: FL1-FITC и FL2-PE в сочетании с FSC и SSC (рис.2а). Этим методом нами проанализированы 20 ВИЧ-инфицированных и 10 здоровых людей. При использовании данного метода популяции и субпопуляции оцениваются по зоне, выбранной размерами клеток (FSC), и с исключением из зоны моноцитов ($CD14^+$) определяется количество



б – проточная цитофлюорометрия с трифлюорохромным окрашиванием клеток. В дот-плоте «CD45-PerCP/SSC-H» выбирается регион, содержащий мононуклеарные клетки. Затем производится анализ выборки в дот-плоте «CD3-FITC/SSC-H» для определения популяции Т-клеток. После этого данный участок анализируется в дот-плотах «CD3-FITC/CD4-PE» или «CD3-FITC/CD8-PE», с помощью которых определяются субпопуляции Т-клеток

дубль-позитивных и FITC- или PE-позитивных клеток. При этом чувствительность метода резко увеличивается, так как: 1) из зоны анализа удаляются моноциты; 2) производится группировка клеток по двум поверхностным антигенам и 3) можно проконтролировать все этапы анализа с помощью сопоставления инвариантной антигенной детерминанты доминирующей популяции (например, CD3 антиген для Т-лимфоцитов). В результате такого анализа количество дубль-

позитивных клеток, например, $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ субпопуляции Т-лимфоцитов, располагаются в соответствующих дот-плотах в противоположной ориентации по отношению друг к другу и, таким образом, можно определить их абсолютное и относительное количество достаточно точно.

В современном иммуноанализе революционным методом иммунофенотипирования клеток является трифлюорохромное окрашивание клеток в сочетании с методом обработки «лизис без отмывки» и компьютерной программы кластерного анализа антигенных детерминант (рис. 26). В настоящее время трехканальное иммунофенотипирование является наиболее точным, воспроизводимым и чувствительным методом при клинических испытаниях анти-ВИЧ и иммуномодулирующих препаратов. Нами в лаборатории клинического центра «Арменикум» методом трехцветного иммунофенотипирования проанализированы 98 ВИЧ-инфицированных и 32 здоровых человека. Данный формат анализа предполагает использование трех флуоресцентных каналов анализа по FL1-FITC, FL2-PE и FL3-PerCP в сочетании с FSC и SSC. При этом

анализируемый регион определяется по наибольшей популяции клеток крови – лейкоцитов, экспрессирующих CD45 антиген, и по гранулярности клеток (CD45PerCP/SSC) с последующей субрегионной сегрегацией Т-лимфоцитов – CD3FITC/SSC. Популяции и субпопуляции иммунофенотипируются по этим регионам как $CD45^+CD3^+CD4^+$ Т-хелперы, $CD45^+CD3^+CD8^+$ – цитотоксические/супрессорные Т-лимфоциты, $CD45^+CD3^+CD19^+$ В-клетки и $CD45^+CD3^+CD16+56$ NK-лимфоциты (рис. 26). С помощью компьютерной программы MultiSET со встроенным аттрактором кластерного анализа антигенных детерминант автоматически определяется абсолютное и относительное количество всех основных популяций и субпопуляций иммуноцитов.

Таким образом, использование метода проточной цитофлюорометрии клеток в сочетании с двух- или трехцветным иммунофенотипированием и кластерным компьютерным анализом данных является наиболее чувствительным, точным и воспроизводимым методом современного иммунологического анализа в клинической практике.

Поступила 11.01.05

Կլինիկական իմունաբանության մեջ լիմֆոցիտների իմունամագնիսական սեպարացիայի և հոսքային ցիտոֆլյուորոմետրիայի մեթոդների զգայունության համեմատական ուսումնասիրությունը

Տ.Կ. Դավթյան, Ս.Ա. Ավետիսյան, Դ.Ա. Պողոսյան

Աշխատանքի նպատակն է իմունակոմպետենտ բջիջների պարունակությունը որոշող մեթոդների՝ հոսքային ցիտոֆլյուորոմետրիա արյան ավտոմատ հեմատոլոգիական քննությամբ զուգորդված և բջիջների իմունամագնիսական սեպարացիա, որին հաջորդում է իմունամագնիսական քննություն, համեմատական հետազոտությունը: Հոդվածում ներկայացվում են այդ մեթոդները և նրանց միջոցով մարդու ծայրամասային արյան իմունակոմպետենտ բջիջների ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) պարունակության տվյալների համեմատությունը: Ուսումնասիրությունները պարզեցին, որ այդ երկու մեթոդներով ստացված տվյալների միջև կան լուրջ

տարբերություններ: Լիմֆոցիտների $CD4^+$, $CD8^+$ բացարձակ քանակությունների որոշումը իմունամագնիսական քննության միջոցով վերարտադրելի չէ, խիստ զգայուն է քննության տեխնիկական պայմանների, հեմատոլոգիական ցուցանիշների և ֆարմակոլոգիական պատրաստուկների ներկայության նկատմամբ: Նույն խնդրի լուծման համար բջիջների հոսքային ցիտոֆլյուորոմետրիկ մեթոդի զուգակցումը երկ- կամ եռգույն իմունամագնիսական սեպարացիայի և տվյալների կլաստերային համակարգչային քննությամբ հանդիսանում է առավել զգայուն, ճշգրիտ և իրագործելի:

Comparative study of the sensitivity of the methods of flow cytofluorometry and immunomagnetic separation of lymphocytes in clinical immunology

T. K. Davtyan, S. A. Avetisyan, D. A. Poghosyan

The aim of the work was the comparative study of two methods applied for the determination of the quantity of immunocompetent cells: flow cytofluorimetry in combi-

nation with automatic hematological analysis of blood, as well as immunomagnetic separation of cells with consequent immunoenzyme analysis. The basics of these meth-

ods are described in the article and a comparison of the results obtained is carried out using them in a study of the quantity of immunocompetent cells (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) in whole human blood. Our studies show that there are serious discrepancies between the data obtained upon the application of flow cytometry and the results of the immunoenzyme analysis. The determination of the absolute quantities of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes using immunoenzyme analysis is irreproducible, the method is

quite sensitive to the technical conditions in which the analysis is carried out, to the hematological indices of blood and to the presence of pharmacological drugs. Flow cytometry of cells, in combination with bi- or tri-chromatic immunophenotyping and cluster computer analysis of the data is the most sensitive, accurate and reproducible method for determination of the absolute quantities of CD4⁺ and CD8⁺.

Литература

1. Boffil M., Janossy G., Lee C.A. et al. Clin. Exp. Immunol., 1992, 88, p.243.
2. Carriere D., Fontaine C., Berthier A.M. et al. Clin. Chem., 1994, 40, p.30.
3. Carriere D., Vendrell J.P., Fontaine C., Jansen A., Reynes J., Pages I., Holzmann C., Laprade M., Pau B. Clin. Chem., 1999, 45, p.92.
4. Guidelines for the Performance of CD4⁺ T-Cell Determinations in Persons with Human Immunodeficiency Virus Infection. CDC, 1992, 41, No RR-S.
5. Revised Guidelines for Performing CD4⁺ T-Cell Determinations in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. CDC, 1997, 461-29.
6. Reimann K.A., O'Gorman M.R.G., Spritzler J., Wilkening C.L. et al. Clin. Diag. Lab. Immunol., 2000, 7, p.344.
7. Reimann K.A., Chernoff M., Wilkening C.L., Nickerson C.E., Landay A.L. Clin. Diag. Lab. Immunol., 2000, 7, p.352.
8. Schnitzlein-Bick C.T., Spritzler J., Wilkening C.L., Nicholson J.K.A., O'Gorman M.R.G., Clin. Diag. Lab. Immunol., 2000, 7, p.336.
9. WHO workshop on flow cytometry and alternative methodologies for CD4 lymphocyte determinations: applications for developing countries. AIDS, 1994, 8, WHO1-WHO4.