

BD Multitest IMK Kit

50 тестов в наборе — кат. № 340503

50 тестов в набор с пробирками

BD Trucount — кат. № 340504

IVD

CE

BD, логотип BD и другие товарные знаки
являются собственностью компании
Becton, Dickinson and Company. © 2010 BD



1/2010

23-13684-05



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences

San Jose, CA 95131
Тел.: 877-232-8995
Факс: 408-954-2347
ClinicalApplications@bd.com

BD Biosciences

Поддержка клиентов в Европе
Тел.: 322-400-9895
Факс: 322-401-7094
help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com

EC REP

BENEX Limited

Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ирландия
Тел.: 353-614-72920
Факс: 353-614-72907

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ	5
Клиническое применение	5
3. ПРИНЦИП МЕТОДА	6
4. РЕАГЕНТЫ	7
Меры предосторожности	9
Хранение и обращение	11
5. ПРИБОР	12
6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	13
Мешающие факторы	13
7. ПРОЦЕДУРА	14
Комплект поставки реагентов	14
Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект	14
Инструкции по разведению лизирующего раствора из BD Multitest IMK Kit	15
Окрашивание клеток	15
Проточная цитометрия	16
Контроль качества	17
8. РЕЗУЛЬТАТЫ	20
Расчет абсолютного значения	20
9. ОГРАНИЧЕНИЯ	21

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ	21
Нормальные диапазоны	21
11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	23
Точность	23
Воспроизводимость	26
Воспроизводимость для одного образца	32
Стабильность	34
Перекрестная реактивность	35
Линейность	35
ГАРАНТИЯ	36
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	37

1. НАЗНАЧЕНИЕ

BD Multitest™ IMK Kit представляет собой комплект реагентов для прямой четырехцветной иммунофлуоресценции, предназначенный для использования с надлежащим образом оснащенным проточным цитометром для идентификации и определения процентных долей и абсолютных количеств следующих субпопуляций зрелых лимфоцитов человека в лизированной цельной крови: Т-лимфоциты (CD3⁺), В-лимфоциты (CD19⁺), Т-хелперы/Т-индукторы (CD3⁺CD4⁺), Т-супрессоры/Т-киллеры (CD3⁺CD8⁺), а также NK-лимфоциты (естественные киллеры) (CD3-CD16⁺ и/или CD56⁺). Пробирки BD Trucount™ используются для определения абсолютных количеств.

Реагенты BD Multitest™ и пробирки BD Trucount могут использоваться с BD FACS™ Loader.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Лимфоциты человека можно разделить на три основные популяции согласно их биологической функции и экспрессии антигена клеточной поверхности: Т-лимфоциты, В-лимфоциты и NK-лимфоциты.

Клиническое применение

Процентные доли и абсолютные количества Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, Т-хелперов/Т-индукторов и Т-супрессоров/Т-киллеров используются для оценки и мониторинга некоторых форм иммунодефицита^{1—3} и аутоиммунных заболеваний.^{4, 5}

Лимфоциты-хелперы/индукторы — это субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3⁺), экспрессирующих антиген CD4⁺. Определение процентных долей или количеств Т-хелперов/Т-индукторов используется при мониторинге лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).⁶ При прогрессировании инфекции пациенты с ВИЧ показывают устойчивое снижение количества Т-хелперов/Т-индукторов.⁷

Для определения процентной доли субпопуляций Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов Центрами по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) рекомендуется использовать комбинации реагентов, содержащие антитела CD3.⁸ BD Multitest IMK Kit позволяет идентифицировать и подсчитать количество Т-хелперов/Т-индукторов отдельно от примеси CD3⁺CD4⁺ моноцитов.^{9–11}

Лимфоциты-супрессоры/киллеры — субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3⁺), экспрессирующих антиген CD8⁺. Процентная доля Т-супрессоров/Т-киллеров выходит за пределы нормального диапазона значений при некоторых аутоиммунных заболеваниях.¹² Относительный удельный вес субпопуляции CD8⁺ повышен у многих пациентов с врожденным или приобретенным иммунодефицитом, таким как тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД)¹ или синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).⁶

НК-лимфоциты, идентифицированные как CD3⁺ и CD16⁺ и (или) CD56⁺ проявляют опосредованную цитотоксичность в отношении определенных опухолей и инфицированных вирусом клеток.¹³ НК-опосредованная цитотоксичность не требует присутствия в целевой клетке молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I или II.¹⁴

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

При добавлении цельной крови к реагентам меченные флуорохромом антитела в реагенте специфично связываются с поверхностными антигенами лейкоцитов. Окрашенные образцы обрабатываются лизирующим раствором из BD Multitest IMK Kit* с целью лизиса эритроцитов. В процессе сбора данных клетки проходят через луч лазера и рассеивают его свет. Окрашенные клетки флуоресцируют. Данные сигналы светорассеяния и флуоресценции, обнаруженные прибором, предоставляют информацию о размере клетки, внутренней сложности и относительной интенсивности флуоресценции.

* Патенты США №№ 4 654 312; 4 902 613; 5 098 849.

Реагенты BD Multitest активируют флуоресценцию, делая возможным гейтирование популяции лимфоцитов для прямой флуоресценции^{9–11} с целью снизить количество проникновений незлизованных или ядродержащих эритроцитов в гейт.

При использовании пробирок BD Trucount определенный объем образца окрашивается непосредственно в пробирке BD Trucount. Лиофилизированный осадок в пробирке растворяется, высвобождая определенное число флуоресцентных частиц. Во время анализа абсолютное количество (клеток/мкл) положительных клеток в образце определяется путем сравнения частоты встречаемости клеток и частиц. При использовании соответствующего программного обеспечения, например клинического программного обеспечения BD FACSCanto™ или программного обеспечения BD Multiset™, абсолютные значения определяются программой. При анализе данных вручную с использованием такого программного обеспечения, как BD CellQuest™, необходимо разделить количество подсчитанных положительных клеток на количество подсчитанных частиц, а затем умножить на концентрацию частиц BD Trucount.

4. РЕАГЕНТЫ

BD Multitest IMK Kit, которого при использовании согласно указаниям достаточно для проведения 50 тестов, поставляется в виде набора флаконов, по одному каждого из следующих реагентов:

- Реагент BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 поставляется в 1 мл буферного солевого раствора с 0,1 % азида натрия.

Реагент содержит меченные FITC антитела к CD3, клон SK7;^{15–17} фикоэритрином (PE) к CD8, клон SK1;^{18, 19} пиридинин-хлорофилл протеином к CD45* (PerCP), клон 2D1 (HLe-1);²⁰ и алофикоцианином (APC) к CD4, клон SK3.^{18, 19, 21}

* Патенты — PerCP: для США 4 876 190;
CD3/CD16 + CD56 для США 4 895 796.

- Реагент BD Multitest CD3/CD16+CD56*/CD45/CD19 поставляется в 1 мл буферного солевого раствора с 0,1 % азиды натрия.

Реагент содержит меченные FITC антитела к CD3, клон SK7; меченные PE антитела к CD16, клон B73.1,^{22—24} и к CD56, клон NCAM 16.2;²⁵ меченные PerCP-антитела к CD45, клон 2D1 (HLe-1), и меченные APC антитела к CD19, клон SJ25C1.²⁶

- Лизирующий раствор из BD Multitest IMK Kit, 10-кратный концентрат в виде запатентованного буферного раствора, содержащего < 15 % формальдегида и < 50 % диэтиленгликоля.

CD3 вступает в реакцию с эpsilon-цепью комплекса рецепторов антигена CD3/антигена Т-клетки (ТкР).²⁷ Антиген CD3 присутствует в 61—85 % лимфоцитов нормальной периферической крови.²⁸

Антиген CD4^{19, 29} с молекулярной массой 55 кДа³⁰ присутствует в субпопуляции Т-лимфоцитов^{31, 32} (CD3⁺CD4⁺), которая включает в себя 28—58 %²⁸ лимфоцитов нормальной периферической крови.^{19, 30} Антиген CD4 в низкой плотности присутствует на поверхности клеток моноцитов и в цитоплазме моноцитов.

Антиген CD8 экспрессируется на α -субъединицах (масса 32-кДа) бимолекулярного комплекса, образованного сшивкой дисульфидными связями.^{33, 34} Антиген CD8 присутствует в субпопуляции Т-лимфоцитов,^{19, 30—32, 35, 36} равно как и в субпопуляции NK-лимфоцитов.³⁷ Антиген CD8 присутствует в 19—48 % лимфоцитов нормальной периферической крови²⁸ и в 60—85 % нормальных тимоцитов.^{19, 30}

CD16 и CD56 вместе способствуют выявлению популяции NK-лимфоцитов^{10, 13} CD16 распознает антигены человеческих NK-лимфоцитов молекулярной массой 50—70 кДа, которые являются рецепторами Fc к IgG.^{22, 23, 38} Реакция CD16 с гранулоцитами вариабельна.²³ CD56 распознает внеклеточный иммуноглобулин-подобный домен, типичный для форм с тремя молекулярными массами (молекулярная масса 120, 140, и 180 кДа) молекулы адгезии нервных клеток (NCAM).^{39—41}

CD19 распознает антиген 90 кДа, присутствующий в В-лимфоцитах человека.^{26, 42} Антиген CD19 присутствует примерно в 7—23 % лимфоцитов периферической крови человека²⁸ и в спленocyтaх.⁴³ Антиген CD19 присутствует в В-лимфоцитах человека на всех стадиях созревания.⁴⁴ CD19 не вступает в реакцию с активированными, а также находящимися в состоянии покоя Т-лимфоцитами, гранулоцитами или моноцитами.⁴⁵

CD45 распознает антигены человеческих лейкоцитов молекулярной массой от 180 до 220 кДа, относящихся к семейству T200.⁴⁶ Антиген CD45 присутствует на всех человеческих лейкоцитах, в том числе лимфоцитах, моноцитах, гранулоцитах, эозинофилах и базофилах в периферической крови и играет определенную роль в передаче сигнала, изменяя сигналы от других молекул на поверхности.⁴⁶ Насколько известно, антитело CD45 слабо вступает в реакцию со зрелыми циркулирующими эритроцитами и тромбоцитами.^{46, 47}

Антитела CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 и CD45 состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁.

Антитело CD56 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG_{2b}.

Каждая пробирка BD Trucount содержит лиофилизированные гранулы флуоресцентных частиц для одноразового использования. В каждом пакете BD Trucount содержится 25 пробирок, чего достаточно для проведения 25 анализов.

Меры предосторожности

- Для диагностики *in vitro*.
- Не использовать реагенты, если наблюдаются какие-либо изменения внешнего вида. Осадок или обесцвечивание свидетельствуют о нестабильности или порче.
- Хотя реагенты антител содержат азид натрия в качестве консерванта, следует принимать меры для исключения микробного загрязнения, которое может приводить к ошибочным результатам.

ОСТОРОЖНО! Азид натрия вреден при приеме внутрь (R22). Держать вдали от пищи, напитков и корма для животных (S13). Использовать подходящую защитную одежду (S36). При попадании внутрь немедленно обратиться за медицинской помощью и покажите данную упаковку или этикетку (S46). При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Азидные соединения при утилизации необходимо смывать большим количеством воды во избежание осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно возникновение взрывоопасных условий.

- **ОСТОРОЖНО!** Лизирующий раствор из BD Multitest IMK Kit содержит диэтиленгликоль и формальдегид. Формальдегид представляет опасность при вдыхании, контакте с кожей и при попадании внутрь (R20/21/22). Он обладает раздражающим действием на глаза и кожу (R36/38). При продолжительном воздействии возможно развитие злокачественных новообразований. Возможен риск необратимых эффектов (R40). При контакте с кожей может вызывать сенсибилизацию (R43). Хранить в закрытом, недоступном для детей месте (S1/2). Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки (S36/37). Диэтиленгликоль даже в малых количествах может быть смертельно опасным. При попадании внутрь немедленно обратиться за медицинской помощью и покажите упаковку или этикетку (S46). Утилизировать согласно федеральным, государственным и местным постановлениям.
- **ОСТОРОЖНО!** Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные материалы. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{48,49} и требуют утилизации с соблюдением надлежащих мер предосторожности в соответствии с федеральными, региональными и местными нормативами. Не выполнять пипетирование ртом. Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки. Насколько известно, фиксация инактивирует ВИЧ.⁵⁰

-
- Для получения точных результатов при использовании пробирок BD Trucount крайне важно добавлять в пробирки BD Trucount точное количество крови. Откалибруйте пипетки, чтобы добавлять ровно 50 мкл образца, либо используйте технику обратного пипетирования (краткое описание см. в пункте 4 на стр. 16). Для получения дополнительной информации см. инструкцию производителя пипетки.
 - Содержание частиц в пробирках BD Trucount разное для каждой партии. Критически важным при введении значения содержания частиц в программное обеспечение или ручном подсчете абсолютного количества является использование значения, которое указано на текущей партии пробирок BD Trucount. Не используйте пробирки из разных партий при проведении одного анализа.
 - Пробирки BD Trucount разработаны для использования со специфичной процедурой лизирования без промывки. Для сбора данных не пытайтесь преодолеть порог прямого светорассеяния (FSC).

Хранение и обращение

- Хранить реагент при температуре от 2 до 8 °C. Не использовать после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Реагент не замораживать и не подвергать воздействию прямого солнечного света при хранении или инкубации с клетками. Пробирка с реагентом должна оставаться сухой.
- Пробирки BD Trucount следует хранить в оригинальном пакете из полимерной пленки при температуре от 2 до 25 °C. Во избежание конденсации пакет следует открывать только после достижения им комнатной температуры и тщательно запечатывать сразу после извлечения пробирки. Проверяйте влагопоглотитель при каждом открывании пакета. Если влагопоглотитель изменил цвет с голубого на бледно-лиловый, утилизируйте оставшиеся пробирки. Закрытый пакет стабилен до истечения срока годности, указанного на упаковке. После истечения срока годности не открывать и не использовать.

Пробирки использовать в течение 1 часа после извлечения из пакета. Оставшиеся пробирки использовать в течение 1 месяца после вскрытия пакета.

5. ПРИБОР

BD Multitest IMK Kit и пробирки BD Trucount предназначены для использования с проточным цитометром, оборудованном соответствующими техническими средствами и программным обеспечением. BD рекомендует серию проточных цитометров BD FACSCanto™, BD FACSCalibur™ или BD FACSsort™. Однако при использовании других платформ также можно получить результаты. Цитометр должен быть оснащен лазерами 635 нм и 488 нм и способен определять рассеяние света (прямое и боковое) и четырехцветную флуоресценцию с излучением, обнаруживаемом в четырех диапазонах:

- 515—545 нм
- 562—607 нм
- > 650 нм
- 652—668 нм

Цитометр должен обладать возможностью установки порогового уровня или дискриминации с использованием канала > 650 нм. С данным прибором можно также использовать BD FACS Loader.

Перед использованием настройте напряжения фотоумножителей (ФУЭ), компенсацию флуоресценции и проверьте чувствительность прибора. Для выполнения данных функций на проточных цитометрах серии BD FACSCanto используйте BD FACST™ 7-color Setup Beads и клиническое программное обеспечение BD FACSCanto. На проточных цитометрах BD FACSCalibur или BD FACSsort используйте частицы BD Calibrite™ и программное обеспечение BD FACSComp™ версии 4.0 или более поздней. Пользователям проточных цитометров производства других компаний (кроме BD) следует обратиться к инструкции производителя по настройке четырехцветного иммунофенотипирования.

В компании BD разработано программное обеспечение, такое как клиническое программное обеспечение BD FACSCanto и программное обеспечение BD Multiset, автоматически рассчитывающее абсолютные значения при использовании пробирок BD Trucount. Тем не менее, для сбора данных и анализа можно использовать другое программное обеспечение, а абсолютные значения могут быть рассчитаны вручную.

6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Произведите забор крови из вены с соблюдением правил асептики, используя пробирки для забора крови BD Vacutainer™.⁵¹ Реагенты из BD Multitest IMK Kit и пробирки BD Trucount проверены как с жидкой, так и с сухой формой EDTA.

Для анализа необходимо не менее 200 мкл цельной крови. Соблюдайте инструкции производителя пробирки для взятия крови в отношении минимального объема крови, который необходимо взять, чтобы обеспечить нужное разбавление образца, особенно при определении абсолютного количества с использованием частиц BD Trucount.

Получите количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу в одном и том же образце цельной крови перед окрашиванием, чтобы убедиться, что количество лейкоцитов находится в пределах линейного диапазона (см. «Линейность» на стр. 35) или чтобы посчитать абсолютные значения по процентным долям.

Антикоагулированную кровь, хранимую при комнатной температуре (от 20 до 25 °C), необходимо окрашивать не позднее 48 часов с момента взятия и анализировать не позднее 24 часов с момента окрашивания.

Мешающие факторы

Не используйте ранее зафиксированные и хранившиеся образцы от пациентов. Образцы крови, охлажденные перед окрашиванием, могут давать искаженные результаты. Образцы, полученные от пациентов, принимающих иммунодепрессанты могут привести к низкому разрешению.⁵² Бластные клетки могут влиять на результаты теста. Следует отказаться от использования гемолизированных образцов.

Не используйте контрольные образцы BD Trucount с подготовленными образцами BD Multitest IMK Kit. Частицы контрольного образца BD Trucount могут влиять на результаты абсолютного значения.

7. ПРОЦЕДУРА

Комплект поставки реагентов

- BD Multitest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC
- BD Multitest CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC
- Пробирки BD Trucount (BD Multitest IMK кат. № 340504)
- Лизирующий раствор из BD Multitest IMK Kit, 10-кратный концентрат

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект

- BD Calibrite 3 и APC частицы (BD кат. №№ 340486 и 340487 соответственно) или
- BD FACS 7-Color Setup Beads (BD кат. № 335775)
- Однократный лизирующий раствор из BD Multitest IMK Kit, разведенный в соответствии со следующим разделом
- Чистая вода (дистиллированная или деионизированная)
- Пробирки BD Vacutainer с EDTA для взятия крови
- Одноразовые полистироловые пробирки BD Falcon™ с крышками 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные (если не используются пробирки BD Trucount)
- Вихревая мешалка «вортекс»
- Дозатор с наконечниками
- Дозатор масс или пипеточный дозатор для дозирования 450 мкл однократного лизирующего раствора BD Multitest
- Проточная жидкость (BD FACSTFlow™, BD кат. № 340398 для США и Латинской Америки или 342003, или эквивалентная)
- Контрольные образцы BD Trucount (BD кат. № 340335), необходимы при использовании пробирок BD Trucount

- Контрольные образцы BD™ Multi-Check (BD кат. №№ 340911, 340912, 340913)
- Контрольные образцы BD™ Multi-Check CD4 Low (BD кат. №№ 340914, 340915, 340916)

Инструкции по разведению лизирующего раствора из BD Multitest IMK Kit

Разведите 10-кратный концентрат деионизированной водой в соотношении 1:10 при комнатной температуре (от 20 до 25 °C). Приготовленный раствор сохраняет стабильность в течение 1 месяца при хранении в стеклянной емкости при комнатной температуре.

Окрашивание клеток

1. Для каждого образца пометьте две пробирки 12 x 75 мм идентификационным номером образца.

Используйте буквенные обозначения (например *A* и *B*), чтобы различать пробирки.

Для абсолютных величин вместо BD Trucount пробирок 12 x 75 мм пометьте две пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ. Перед использованием следует удостовериться, что осадок частиц BD Trucount находится под металлической сеточкой на дне пробирки. Если это не так, утилизируйте пробирку BD Trucount и используйте новую. Не переносите частицы в другую пробирку.

2. Внесите 20 мкл реагента BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 на дно каждой пробирки, помеченной буквой *A*.
3. Внесите 20 мкл реагента BD Multitest CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 на дно каждой пробирки, помеченной буквой *B*.

При использовании пробирок BD Trucount, внесите чуть выше сеточки из нержавеющей стали. Не прикасайтесь к осадку.

4. Внесите 50 мкл хорошо перемешанной цельной крови с антикоагулянтом в нижнюю часть каждой пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ. Не допускайте растекания крови по стенкам пробирки. Если цельная кровь останется на стенках трубки, она не будет окрашена реагентом, что может повлиять на результаты.

Аккуратное внесение особенно важно при использовании пробирки BD Trucount. Используйте технику обратного пипетирования для введения образца на стенку пробирки чуть выше сеточки.

Для обратного пипетирования нажмите кнопку дозатора до второго упора. После отпущения кнопки образец поступает в наконечник с избытком. Нажмите кнопку до первого упора, чтобы выдать точный объем образца. Избыток образца останется в наконечнике.

5. Закройте пробирки и аккуратно перемешайте на вортексе.

Инкубируйте в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).

6. Добавьте в каждую пробирку 450 мкл однократного лизирующего раствора BD Multitest.

Защищайте пробирки от попадания прямого света. Выполняйте процедуру при комнатной температуре (от 20 до 25 °C). См. «Меры предосторожности» на стр. 9 и «Мешающие факторы» на стр. 13.

7. Закройте пробирки и аккуратно перемешайте на вортексе.

Инкубируйте в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).

Образцы готовы к анализу на проточном цитометре.

Проточная цитометрия

Если образцы не будут проанализированы сразу после подготовки, их следует хранить в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).

Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки на вортексе на малой скорости.⁵³ При использовании BD FACS Loader перемешайте содержимое пробирок на вортексе непосредственно перед их размещением в подставки загрузчика. Соберите и проанализируйте данные в режиме списка, используя клиническое программное обеспечение BD FACSCanto, программное обеспечение BD Multiset или BD CellQuest. Прежде чем анализировать образцы, отрегулируйте порог для минимизации дребриса и убедитесь, что целевые популяции включены в анализ.

Контроль качества

В соответствии с рекомендациями Колледжа американских патологов (CAP) компания BD рекомендует использовать два уровня жидких контрольных материалов (процедурный контроль). Их следует обработать как образцы от пациентов для контроля функционирования всего аналитического процесса. Это следует делать по крайней мере один раз в день проведения анализов.⁵⁴ Компания BD предлагает контроль BD Multi-Check (BD кат. №№ 340911, 340912, 340913) и контроль BD Multi-Check CD4 Low (BD кат. №№ 340914, 340915, 340916).

При каждом запуске для оценки производительности системы используйте коммерческие контрольные образцы с установленными уровнями процентных долей и абсолютных величин.

Визуально проверьте точечную диаграмму CD45 и SSC. Популяция лимфоцитов должна отображаться в виде яркого, компактного кластера с низким SSC. Моноциты и гранулоциты также должны отображаться в виде отчетливых кластеров. Не продолжайте анализ, если популяции рассеяны, и отсутствует либо очень слабое разделение между кластерами.

На рис. 1, рис. 2 и рис. 3 (стр. 18) изображены репрезентативные данные гематологически нормального образца взрослого человека, окрашенного CD3/CD8/CD45/CD4 в пробирке BD Trucount.

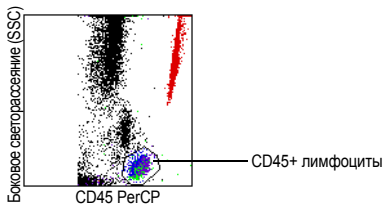


Рис. 1. Идентификация лимфоцитов на точечной диаграмме CD45 и SSC

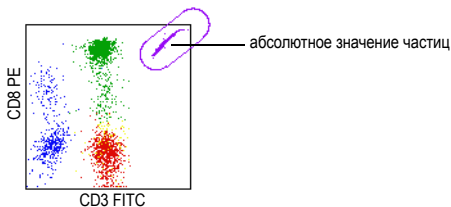


Рис. 2. BD Trucount, абсолютное значение частиц

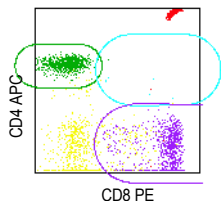


Рис. 3. Идентификация Т-супрессоров/Т-киллеров ($CD3^+CD8^+$) и Т-хелперов/Т-индукторов ($CD3^+CD4^+$) на точечной диаграмме CD8 и CD4

На рис. 4, рис. 5 на стр. 19 и рис. 6 на стр. 20 изображены репрезентативные данные гематологически нормального образца взрослого человека, окрашенного CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 в пробирке BD Trucount.

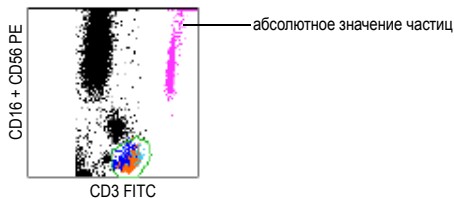


Рис. 4. Идентификация лимфоцитов на точечной диаграмме CD45 и SSC

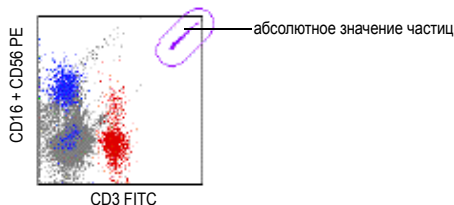


Рис. 5. BD Trucount, абсолютное значение частиц

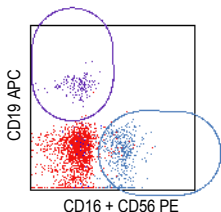


Рис. 6. Идентификация В-лимфоцитов (CD19⁺) и NK-лимфоцитов (CD3-CD16⁺ или CD56⁺, или обоих) на точечной диаграмме CD16 + CD56 и CD19

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты представлены в виде процентной доли положительных клеток в популяции лимфоцитов либо в виде количества положительных клеток на микролитр крови (абсолютное значение).

Расчет абсолютного значения

Во время анализа абсолютное количество (клеток/мкл) положительных клеток в образце определяется путем сравнения частоты встречаемости клеток и частиц. При использовании клинического программного обеспечения BD FACSCanto или программного обеспечения BD Multiset абсолютные значения рассчитываются автоматически. Для расчета абсолютных значений вручную при использовании программного обеспечения BD CellQuest или другого используйте следующую формулу.

$$\frac{\text{частота событий в популяции клеток}}{\text{частота событий в области абсолютного значения частиц}} \times \frac{\text{кол-во частиц/тест*}}{\text{тестируемый объем}} = \text{абсолютное количество клеток популяции}$$

* Это значение указано на этикетке пакета с пробирками BD Trucount и в различных партиях может варьироваться.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Лаборатории должны устанавливать свои собственные диапазоны нормальных значений параметров BD Multitest IMK Kit, на которые могут оказывать влияние пол пациента, его возраст и процедура подготовки образца. Расовая принадлежность пациента⁵⁵ и индивидуальные вариации экспрессии эпитопов⁵⁶ также могут оказывать влияние, хотя в настоящее время недостаточно данных для подтверждения данного факта. Возраст, пол, клиническое состояние и расовая принадлежность пациента должны быть известны при определении диапазона нормальных значений.⁵⁷ Указанные диапазоны нормальных значений носят только информационный характер.
- BD Multitest IMK Kit не проверен компанией BD Biosciences для использования с жидкими антикоагулянтами гепарином и ACD (кислота-цитрат-декстроза) при расчете абсолютных значений с использованием пробирок BD Trucount.
- BD Multitest IMK Kit не предназначен для скрининга образцов на наличие лейкемических клеток или для фенотипирования образцов крови больных лейкозом.
- Абсолютные значения различны в лабораториях, использующих оборудование разных производителей.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Нормальные диапазоны

Нормальные значения для BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4, CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 и BD Multitest IMK Kit, представленные в табл. 1, табл. 2 и табл. 3 на стр. 22, были определены в трех клинических исследовательских центрах в США. Субъектами выступали взрослые здоровые люди в возрасте от 18 до 65 лет. Для получения дополнительной информации о нормальных значениях см. первое ограничение в предыдущем разделе.

Табл. 1. Репрезентативные нормальные диапазоны
для BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4

Субпопуляция	n	Среднее значение	95 %-ый диапазон
Т-хелперы/Т-индукторы (%)	164	45	33—58
Т-супрессоры/Т-киллеры (%)	164	24	13—39
Всего Т-лимфоцитов (%)	164	72	56—86
Т-хелперы/Т-индукторы (клеток/мкл)	164	941	404—1612
Т-супрессоры/Т-киллеры (клеток/мкл)	164	511	220—1129
Всего Т-лимфоцитов (клеток/мкл)	164	1513	723—2737

Табл. 2. Репрезентативные нормальные диапазоны
для BD Multitest CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19

Субпопуляция	n	Среднее значение	95 %-ый диапазон
НК-лимфоциты (%)	164	13	5—26
В-лимфоциты (%)	164	14	5—22
Т-лимфоциты (%)	164	72	56—86
НК-лимфоциты (клеток/мкл)	164	267	84—724
В-лимфоциты (клеток/мкл)	164	293	80—616
Т-лимфоциты (клеток/мкл)	164	1507	754—2764

Табл. 3. Репрезентативные нормальные диапазоны
для набора BD Multitest IMK

Субпопуляция	n	Среднее значение	95 %-ый диапазон
Т-лимфоциты (%)	164	72	56—86
Т-лимфоциты (клеток/мкл)	164	1510	742—2750

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики реагентов были установлены в результате испытаний в лабораториях BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния, и в трех клинических лабораториях США.

Точность

Проточный цитометр BD FACSCanto II

Подсчет процентных долей и абсолютных значений субпопуляции лимфоцитов производился с использованием реагентов BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 и CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 в пробирках BD Trucount и анализировался на проточном цитометре BD FACSCanto II с использованием клинического программного обеспечения BD FACSCanto версии 2.1. Результаты сравнивались с результатами, полученными при анализе реагентов на проточном цитометре BD FACSCanto с использованием клинического программного обеспечения BD FACSCanto версии 2.0.

Образцы цельной крови брались случайным образом в одной клинической лаборатории. Статистика регрессии приведена в табл. 4 на стр. 23.

Табл. 4. Регрессионный анализ для абсолютных значений и процентных долей субпопуляций (проточный цитометр BD FACSCanto II)

Субпопуляция лимфоцитов	n	Единица измерения	R ²	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Диапазон
CD3 ⁺ CD4 ⁺	104	клеток/мкл	0,986	0,95	18,25	11—1905
		%	0,994	1,01	0,20	2—57
CD3 ⁺ CD8 ⁺	104	клеток/мкл	0,988	0,95	28,36	68—3577
		%	0,993	1,00	0,34	11—81
Общее значение CD3 ⁺	104	клеток/мкл	0,991	0,97	27,59	221—3873
		%	0,984	0,97	2,72	52—92

Табл. 4. Регрессионный анализ для абсолютных значений и процентных долей субпопуляций (проточный цитометр BD FACSCanto II)

Субпопуляция лимфоцитов	n	Единица измерения	R ²	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Диапазон
CD3 ⁺ CD19 ⁺	104	клеток/мкл	0,979	0,97	2,37	0—834
		%	0,986	0,97	0,32	0—38
CD3 ⁺ (CD16 + CD56) ⁺	104	клеток/мкл	0,961	0,88	10,56	20—606
		%	0,957	0,93	0,19	2—32

Проточный цитометр BD FACSCanto

Подсчет процентных долей и абсолютных значений субпопуляции лимфоцитов производился с использованием реагентов BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 и CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 в пробирках BD Trucount и анализировался на проточном цитометре BD FACSCanto II с использованием клинического программного обеспечения BD FACSCanto версии 2.0. Результаты сравнивались с результатами, полученными при анализе реагентов на проточном цитометре BD FACSCalibur с использованием клинического программного обеспечения BD Multiset. См. табл. 5.

Табл. 5. Регрессионный анализ для абсолютных значений и процентных долей субпопуляций (проточный цитометр BD FACSCanto)

Субпопуляция лимфоцитов	n	Единица измерения	R	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Диапазон
CD3 ⁺ CD4 ⁺	108	клеток/мкл	0,991	0,97	10,80	3—3211
		%	0,998	0,99	0,26	1—70
CD3 ⁺ CD8 ⁺	108	клеток/мкл	0,983	0,96	24,60	68—2754
		%	0,996	1,00	0,27	10—81

Табл. 5. Регрессионный анализ для абсолютных значений и процентных долей субпопуляций (проточный цитометр BD FACSCanto)

Субпопуляция лимфоцитов	n	Единица измерения	R	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Диапазон
Общее значение CD3 ⁺	108	клеток/мкл	0,987	0,99	-6,27	75—5257
		%	0,993	1,00	-0,17	40—93
CD3-CD19 ⁺	108	клеток/мкл	0,990	1,02	-7,93	0—2527
		%	0,994	0,99	-0,05	0—42
CD3 ⁺ (CD16 + CD56) ⁺	108	клеток/мкл	0,981	0,95	10,80	11—1374
		%	0,989	1,00	0,39	2—45

Проточный цитометр BD FACSCalibur

Подсчет процентных долей и абсолютных значений субпопуляции лимфоцитов производился с использованием реагентов BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 и CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 в пробирках BD Trucount и затем сравнивался с результатами, полученными при анализе реагентов BD Tritest CD3/CD4/CD45, CD3/CD8/CD45, CD3/CD16 + CD56/CD45, или CD3/CD19/CD45 в пробирках BD Trucount.

Образцы цельной крови доноров с нормальными и аномальными показателями забирались случайным образом в двух клинических лабораториях и проверялись на обеих системах. Статистика регрессии, приведенная в табл. 6 и табл. 7, показывает практически эквивалентные результаты.

Табл. 6. Перрессионный анализ для BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4
(проточный цитометр BD FACSCalibur)

Субпопуляция	n	R	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Диапазон
Т-хелперы/Т-индукторы (%)	124	1,0	0,996	-0,434	1—62
Т-супрессоры/Т-киллеры (%)	124	1,0	1,018	-0,383	13—78
Всего Т-лимфоцитов (%)	124	1,0	1,002	0,254	22—90
Т-хелперы/Т-индукторы (клеток/мкл)	124	0,98	1,015	-7,692	93—1904
Т-супрессоры/Т-киллеры (клеток/мкл)	124	0,99	1,001	2,494	132—2229
Всего Т-лимфоцитов (клеток/мкл)	124	0,98	1,028	-20,451	189—2987

Табл. 7. Перрессионный анализ для BD Multitest CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19

Субпопуляция	n	R	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Диапазон
НК-лимфоциты (%)	126	0,97	0,97	-0,85	3—40,0
В-лимфоциты (%)	126	0,99	0,98	-0,25	0—59
Т-лимфоциты (%)	126	0,99	0,99	1,74	21,5—90,0
НК-лимфоциты (клеток/мкл)	126	0,96	0,92	-5,44	37—901
В-лимфоциты (клеток/мкл)	126	0,98	0,95	1,77	3—877,6
Т-лимфоциты (клеток/мкл)	126	0,98	1,01	-10,18	100—2883

Воспроизводимость

Проточный цитометр BD FACSCanto II

Оценка воспроизводимости производилась в одном месте, компании BD Biosciences, с использованием двух идентичных образцов при двух разных уровнях концентрации аналита. Образцы были проанализированы на трех различных приборах тремя разными операторами (один оператор и

один прибор в день). Два отдельных анализа были произведены в течение каждого из 21 дней тестирования, что в общей сложности составляет 42 анализа. Перед каждым из 42 анализов была произведена калибровка с использованием BD FACS 7-Color Setup Beads. На всем протяжении исследования использовалась одна партия реагентов и калибровочных частиц. В табл. 8 приведены концентрации, при которых проводился анализ воспроизводимости.

Табл. 8. Концентрации, при которых проводился анализ воспроизводимости (проточный цитометр BD FACSCanto II)

Субпопуляция лимфоцитов (%)	Среднее значение CDL ^a	Среднее значение CDC ^b
CD3 ⁺ CD4 ⁺	10,3	46,8
CD3 ⁺ CD8 ⁺	43,2	25,4
Общее значение CD3 ⁺	54,1	73,0
CD3 ⁻ CD19 ⁺	26,1	15,4
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	18,2	10,6
Субпопуляция лимфоцитов (клеток/мкл)	Среднее значение CDL	Среднее значение CDC
CD3 ⁺ CD4 ⁺	205,6	1347,1
CD3 ⁺ CD8 ⁺	866,0	731,4
Общее значение CD3 ⁺	1086,0	2105,4
CD3 ⁻ CD19 ⁺	526,1	443,5
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	367,1	306,3

a. CDL = контроль CD-Chex® Plus CD4 Low

(CD-Chex является зарегистрированным товарным знаком компании Streck, Inc.)

b. CDC = контроль CD-Chex Plus

Воспроизводимые стандартные отклонения (SD) и коэффициенты вариации (CV) для процентных долей и абсолютных значений субпопуляций приведены в табл. 9 и табл. 10, воспроизводимость для одного прибора приведена в табл. 11 и табл. 12 на стр. 29.

Табл. 9. Воспроизводимость процентных долей субпопуляции

Субпопуляция лимфоцитов (%)	CDL ^a SD	CDC ^b SD
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,53	0,81
CD3 ⁺ CD8 ⁺	1,33	0,78
Общее значение CD3 ⁺	0,96	0,63
CD3 ⁻ CD19 ⁺	0,86	0,54
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	0,87	0,51

a. CDL = контроль CD-Chex Plus CD4 Low

b. CDC = контроль CD-Chex Plus

Табл. 10. Воспроизводимость абсолютных значений

Субпопуляция лимфоцитов (клеток/мкл)	CDL ^a %CV	CDC ^b %CV
CD3 ⁺ CD4 ⁺	5,9	3,6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	3,8	4,7
Общее значение CD3 ⁺	3,5	2,7
CD3 ⁻ CD19 ⁺	6,2	5,5
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	5,9	6,0

a. CDL = контроль CD-Chex Plus CD4 Low

b. CDC = контроль CD-Chex Plus

Табл. 11. Воспроизводимость процентных долей для одного прибора

Субпопуляция лимфоцитов (%)	CDL ^a SD	CDC ^b SD
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,53	0,82
CD3 ⁺ CD8 ⁺	1,34	0,80
Общее значение CD3 ⁺	0,98	0,67
CD3 ⁻ CD19 ⁺	0,86	0,56
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	0,87	0,52

a. CDL = контроль CD-Chex Plus CD4 Low

b. CDC = контроль CD-Chex Plus

Табл. 12. Воспроизводимость абсолютных значений для одного прибора

Субпопуляция лимфоцитов (клеток/мкл)	CDL ^a %CV	CDC ^b %CV
CD3 ⁺ CD4 ⁺	5,9	3,8
CD3 ⁺ CD8 ⁺	3,9	4,7
Общее значение CD3 ⁺	3,6	2,9
CD3 ⁻ CD19 ⁺	6,4	5,6
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	6,1	6,0

a. CDL = контроль CD-Chex Plus CD4 Low

b. CDC = контроль CD-Chex Plus

Проточный цитометр BD FACSCanto

Оценка воспроизводимости производилась в одном месте, компании BD Biosciences, с использованием двух идентичных образцов при двух разных уровнях концентрации аналита. Образцы были проанализированы на трех различных приборах тремя разными операторами (один оператор и один прибор в день). Два отдельных анализа были произведены в течение каждого из 20 дней тестирования,

что в общей сложности составляет 40 анализов. Перед каждым из 40 анализов была произведена калибровка с использованием BD FACS 7-Color Setup Beads. На всем протяжении исследования использовалась одна партия реагентов и калибровочных частиц. В табл. 13 приведены концентрации, при которых проводился анализ воспроизводимости.

Табл. 13. Концентрации, при которых проводился анализ воспроизводимости (проточный цитометр BD FACSCanto)

Субпопуляция лимфоцитов (%)	Среднее значение MCL ^a	Среднее значение MCN ^b
CD3 ⁺ CD4 ⁺	17,6	50,3
CD3 ⁺ CD8 ⁺	39,1	19,8
Общее значение CD3 ⁺	57,5	69,9
CD3 ⁻ CD19 ⁺	20,5	13,6
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	18,6	13,7
Субпопуляция лимфоцитов (клеток/мкл)	Среднее значение MCL	Среднее значение MCN
CD3 ⁺ CD4 ⁺	94,9	539,4
CD3 ⁺ CD8 ⁺	210,7	212,8
Общее значение CD3 ⁺	307,4	743,9
CD3 ⁻ CD19 ⁺	108,5	143,3
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	98,6	145,0

a. MCL = контроль BD Multi-Check CD4 Low

b. MCN = контроль BD Multi-Check

Воспроизводимые стандартные отклонения (SD) и коэффициенты вариации (CV) для процентных долей и абсолютных значений субпопуляций приведены в табл. 14 и табл. 15 на стр. 31, воспроизводимость для одного прибора приведена в табл. 16 и табл. 17 на стр. 32.

Табл. 14. Воспроизводимость процентных долей субпопуляции

Субпопуляция лимфоцитов (%)	MCL ^a SD	MCN ^b SD
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,73	1,04
CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,97	1,03
Общее значение CD3 ⁺	1,16	1,15
CD3 ⁻ CD19 ⁺	0,70	0,68
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	1,03	0,89

a. MCL = контроль BD Multi-Check CD4 Low

b. MCN = контроль BD Multi-Check

Табл. 15. Воспроизводимость абсолютных значений

Субпопуляция лимфоцитов (клеток/мкл)	MCL ^a %CV	MCN ^b %CV
CD3 ⁺ CD4 ⁺	5,8	5,7
CD3 ⁺ CD8 ⁺	5,1	6,4
Общее значение CD3 ⁺	3,2	3,9
CD3 ⁻ CD19 ⁺	4,9	7,0
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	6,6	8,0

a. MCL = контроль BD Multi-Check CD4 Low

b. MCN = контроль BD Multi-Check

Табл. 16. Воспроизводимость процентных долей для одного прибора

Субпопуляция лимфоцитов (%)	MCL ^a SD	MCN ^b SD
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,77	1,18
CD3 ⁺ CD8 ⁺	1,17	1,15
Общее значение CD3 ⁺	1,22	1,21
CD3 ⁻ CD19 ⁺	1,05	0,77
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	1,14	1,03

a. MCL = контроль BD Multi-Check CD4 Low

b. MCN = контроль BD Multi-Check

Табл. 17. Воспроизводимость абсолютных значений для одного прибора

Субпопуляция лимфоцитов (клеток/мкл)	MCL ^a %CV	MCN ^b %CV
CD3 ⁺ CD4 ⁺	6,5	5,9
CD3 ⁺ CD8 ⁺	5,8	7,1
Общее значение CD3 ⁺	4,1	4,8
CD3 ⁻ CD19 ⁺	7,1	7,8
CD3 ⁻ (CD16 + CD56) ⁺	8,2	9,9

a. MCL = контроль BD Multi-Check CD4 Low

b. MCN = контроль BD Multi-Check

Воспроизводимость для одного образца

Проточный цитометр BD FACSCalibur

Оценка воспроизводимости с использованием одного образца была сделана в трех клинических лабораториях путем пятикратного повторения анализа каждого из образцов, забранных у здоровых и нездоровых доноров. Средние значения, стандартные отклонения (SD) и коэффициенты вариации (CV) или оба значения для процентных долей и абсолютных значений субпопуляций, больших

чем 100 клеток/мкл, приведены в табл. 18 и табл. 19 (BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4) и табл. 20 на стр. 33, а также табл. 21 на стр. 34 (BD Multitest CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19).

Табл. 18. Воспроизводимость процентных долей субпопуляции BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 с использованием одного образца

Субпопуляция	n	Среднее значение (%)	SD
Т-хелперы/Т-индукторы (%)	46	26,1	0,85
Т-супрессоры/Т-киллеры (%)	46	42,0	0,93
Всего Т-лимфоцитов	46	72,0	1,06

Табл. 19. Воспроизводимость абсолютных значений для одного образца BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4

Субпопуляция	n	Среднее значение (клеток/мкл)	%CV
Т-хелперы/Т-индукторы (%)	38	565,2	7,02
Т-супрессоры/Т-киллеры (%)	46	687,8	6,79
Всего Т-лимфоцитов	46	1219,9	6,34

Табл. 20. Воспроизводимость абсолютных значений для одного образца BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

Субпопуляция	n	Среднее значение (%)	SD
NK-лимфоциты	46	10,8	0,73
В-лимфоциты	46	15,6	0,71
Т-лимфоциты	46	72,1	0,99

Табл. 21. Воспроизводимость абсолютных значений
для одного образца BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

Субпопуляция	n	Среднее значение (клеток/мкл)	%CV
NK-лимфоциты	33	217	8,3
В-лимфоциты	37	278	5,8
Т-лимфоциты	46	1217	4,7

Стабильность

Стабильность реагентов BD Multitest в пробирках BD Trucount оценивалась путем исследования:

- изменений, связанных с хранением цельной крови перед окрашиванием;
- изменений в результате временного интервала между окрашиванием и сбором данных;
- совмещения этих двух эффектов.

Образцы цельной крови тестировались не позднее 48 часов после забора, окрашенные образцы — не позднее 24 часов после окрашивания. Все образцы перед окрашиванием или сбором данных содержались при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).

Основываясь на результатах этого исследования,* компания BD рекомендует проводить окрашивание в пределах 48 часов после забора и анализировать окрашенные образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

* Данные доступны в BD Biosciences.

Перекрестная реактивность

Антитела к CD8 реагируют с NK-лимфоцитами³⁷, а также с Т-супрессорами/Т-киллерами. Антитела к CD4 реагируют с моноцитами, а также с Т-хелперами/Т-индукторами.²¹ Антиген CD16 экспрессируется на нейтрофилах.¹⁴ Антиген CD56 присутствует примерно в 5 % лимфоцитов CD3⁺ периферической крови.¹⁴

Линейность

Проточный цитометр BD FACSCanto II

Линейность анализа BD Multitest IMK Kit оценивалась в системе BD FACSCanto II в пределах концентрации лейкоцитов от 0 до $3,3 \times 10^4$ клеток/мкл. В пределах указанных диапазонов наблюдалась линейность полученных результатов.

Субпопуляция	Диапазон (клеток/мкл)
CD4	1—3669
CD8	2—2324
CD3	6—5998
CD19	1—857
CD16 + CD56	1—447

Проточный цитометр BD FACSCanto

Линейность анализа BD Multitest IMK Kit оценивалась в системе BD FACSCanto в пределах концентрации лейкоцитов от 0 до $3,0 \times 10^4$ клеток/мкл. В пределах указанных диапазонов наблюдалась линейность полученных результатов.

Субпопуляция	Диапазон (клеток/мкл)
CD4	29—5827
CD8	22—4076
CD3	48—9627
CD19	5—1131
CD16 + CD56	4—671

Проточный цитометр BD FACSCalibur

Линейность BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 и CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 оценивалась в пределах концентрации лейкоцитов от $0,2 \times 10^3$ до $29,7 \times 10^3$ клеток/мкл и концентрации лимфоцитов от $0,1 \times 10^3$ до $9,0 \times 10^3$ клеток/мкл. Линейность полученных результатов наблюдалась для диапазонов CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3-CD16 + CD56⁺ и CD19⁺.

ГАРАНТИЯ

Если иное не оговорено в каких-либо действующих общих условиях продаж компании BD для клиентов за пределами США, на приобретение данных продуктов распространяются следующие гарантийные обязательства.

для ПРОДАВАЕМЫХ СОГЛАСНО ДАННЫМ УСЛОВИЯМ ПРОДУКТОВ ГАРАНТИРУЕТСЯ ТОЛЬКО СОБЛЮЖДЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И СОДЕРЖИМОГО, УКАЗАННЫХ НА ЭТИКЕТКЕ ИЛИ МАРКИРОВКЕ ПРОДУКТА НА МОМЕНТ ДОСТАВКИ ЗАКАЗЧИКУ. КОМПАНИЯ BD НАСТОЯЩИМ ОТВЕРГАЕТ ЛЮБЫЕ ДРУГИЕ ГАРАНТИИ, ЯВНЫЕ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫЕ, ВКЛЮЧАЯ ГАРАНТИИ КОММЕРЧЕСКОЙ ВЫГОДЫ, ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ КОНКРЕТНЫХ ЦЕЛЕЙ И НЕНАРУШЕНИЯ ПРАВ ТРЕТЬИХ СТОРОН. ВСЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ BD ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЛИБО ЗАМЕНОЙ ПРОДУКТОВ, ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ЦЕНЫ ПОКУПКИ. КОМПАНИЯ BD НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА ПОВРЕЖДЕНИЕ ИМУЩЕСТВА И ЛЮБОЙ СОПУТСТВУЮЩИЙ ИЛИ КОСВЕННЫЙ УЩЕРБ, ВКЛЮЧАЯ ТРАВМЫ И ЭКОНОМИЧЕСКИЕ УБЫТКИ, ВЫЗВАННЫЕ ДАННЫМ ПРОДУКТОМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Science*. 1989;59:200-206.
2. Nicholson JKA. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Lab Med*. 1989;113:598-605.
3. Foucar K, Goeken JA. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Med*. 1982;13:403-413.
4. Cohen SB, Weetman AP. Activated interstitial and intraepithelial thyroid lymphocytes in autoimmune thyroid disease. *Acta Endocrinol*. 1988;119:161-166.
5. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
6. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:55-61.
7. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS*. 1990;4:479-497.
8. Centers for Disease Control. 1997 Revised guidelines for performing CD4⁺ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*. 1997;46 (No. RR-2):1-29.
9. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. CD4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. *Cytometry*. 1993;14:685-689.
10. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry*. 1996;26:227-230.
11. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry*. 1996;26:16-21.
12. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8⁺ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol*. 1986;137:3436-3439.
13. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. In: Ades EW, Lopez C, eds. *Natural Killer Cells and Host Defense*. Basel: Karger; 1989:1.
14. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
15. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing IV: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:3-30.

16. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti-Leu-4 antibody. *J Immunol.* 1983;131:536-539.
17. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:259-288.
18. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984;25:60-30.
19. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to the T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:544-548.
20. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
21. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol.* 1983;131:212-216.
22. Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol.* 1983;130:2142-2148.
23. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol.* 1983;130:2133-2141.
24. Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Durken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
25. Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. NK-cell antigens: section report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:21367.
26. Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing IV: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:3-43.
27. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood.* 1988;71:603-612.
28. Reichert T, DeBruyere M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath.* 1991;60:190-208.
29. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories: In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984;9:108-30.

-
30. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med.* 1981;153:310-323.
 31. Engleman EG, Benike CJ, Glickman E, Evans RL. Antibodies to membrane structures that distinguish suppressor/cytotoxic and helper T lymphocyte subpopulations block the mixed leukocyte reaction in man. *J Exp Med.* 1981;153:193-198.
 32. Kotzin BK, Benike CJ, Engleman EG. Induction of immunoglobulin secreting cells in the allogeneic mixed leukocyte reaction: regulation by helper and suppressor lymphocyte subsets in man. *J Immunol.* 1981;127:931-935.
 33. Schwinzer R. Cluster report: CD8 In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
 34. Terry LA, Disanto JP, Small TN, Flomenberg N. Differential expression of the CD8 and Lyt-3 antigens on a subset of human T-cell receptor γ/δ -bearing lymphocytes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:345-346.
 35. Engleman EG, Benike CJ, Glickman E, Evans RL. Circulating antigen-specific suppressor T cells in a healthy woman: mechanism of action and isolation with a monoclonal antibody. *Clin Res.* 1981;29:365A.
 36. Ledbetter JA, Frankel AE, Herzenberg LA. Human Leu T-cell differentiation antigens: quantitative expression on normal lymphoid cells and cell lines. In: Hämmerling G, Hämmerling U, Kearney J, eds. *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas: Perspectives and Technical Notes.* New York, NY: Elsevier/North Holland; 1981:16-22.
 37. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol.* 1983;131:1789-1796.
 38. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1984;133:180-189.
 39. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol.* 1991;146:4421-4426.
 40. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
 41. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science.* 1987;236:799-806.

-
42. Moldenhauer G, Dörken B, Schwartz R, Pezzutto A, Knops J, Hammerling GJ. Analysis of ten B lymphocyte-specific workshop monoclonal antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing IV: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:61-67.
 43. Tedder T, Zhou L-J, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15:437-442.
 44. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19 In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
 45. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B-lymphocyte development. *Blood*. 1987;70:1316-1324.
 46. Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
 47. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:43-55.
 48. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections—Second Edition; Approved Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2001. NCCLS document M29-A2.
 49. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
 50. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993;160:215-218.
 51. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture—Fourth Edition; Approved Standard*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.
 52. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
 53. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
 54. Flow Cytometry Checklist. In: College of American Pathologists (CAP) Flow Cytometry Checklist, Dec 2004: www.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/checklists_flow_cytometry_december2004.doc

-
55. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 1985;3:33-37.
 56. Angadi CV. Lack of Leu-3a epitope on T-helper (CD4) lymphocytes. *J Clin Lab Anal*. 1990;4:193-195.
 57. *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Second Edition*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000. NCCLS document C28-A2.