



MultiTEST CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC Reagent

50 тестов на флакон — кат. № 342417

50 тестов на флакон с пробирками
TruCOUNT — кат. № 342447

Для определения процентных долей и абсолютных значений Т-хелперов/Т-индукторов и Т-супрессоров/Т-киллеров в лизированной цельной крови человека.

6/2010

23-13679-01



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



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences

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



BENEX Limited

Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ирландия

Тел.: 353-61-472920
Факс: 353-61-472907

BD Biosciences

Поддержка клиентов в Европе

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

bdbiosciences.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

BD MultiTEST™ CD3 флуоресцеин изотиоцианат (FITC)/CD8 фикоэритрин* (PE)/CD45 перидинин-хлорофилл протеин† (PerCP)/CD4 алофикоцианин* (APC) представляет собой реагент для прямой четырехцветной иммунофлуоресценции, предназначенный для использования с надлежащим образом оснащенным проточным цитометром для идентификации и определения процентных долей и абсолютных значений следующих субпопуляций зрелых лимфоцитов человека в цельной лизированной крови: зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-супрессоров/Т-киллеров (CD3⁺CD8⁺) и Т-хелперов/Т-индукторов (CD3⁺CD4⁺). При использовании с пробирками TruCOUNT™ подсчет абсолютных значений этих субпопуляций можно выполнить в одной пробирке.

Реагент BD MultiTEST и пробирки TruCOUNT могут использоваться с FACS Loader.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Лимфоциты человека можно разделить на три большие популяции согласно их биологической функции и экспрессии поверхностного антигена: Т-лимфоциты, В-лимфоциты и естественные киллеры (NK-лимфоциты).

Клиническое применение

Лимфоциты-супрессоры/киллеры — субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3⁺), экспрессирующих антиген CD8⁺. Лимфоциты-хелперы/индукторы — это субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3⁺), экспрессирующих антиген CD4⁺.

* Патент США № 4 520 110, Европейский патент № 7 6695, патент Канады № 1 179 942.

† Патент США № 4 876 190.

Процентные доли и абсолютные значения CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺ используются для оценки и мониторинга некоторых форм иммунодефицита^{1–3} и аутоиммунных заболеваний.^{4, 5}

Определение процентных долей или значений Т-хелперов/Т-индукторов используется при мониторинге лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека ВИЧ.⁶ При прогрессировании инфекции пациенты с ВИЧ, как правило, показывают устойчивое снижение количества Т-хелперов/Т-индукторов.⁷

Процентная доля Т-супрессоров/Т-киллеров выходит за пределы нормального диапазона значений при некоторых аутоиммунных заболеваниях.⁸ Относительная процентная доля субпопуляции CD8⁺ повышена у многих пациентов с врожденным или приобретенным иммунодефицитом, таким как тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД)¹ или синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).⁶

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 CD3.⁹ Реагент MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4 reagent позволяет идентифицировать и подсчитать количество Т-хелперов/Т-индукторов отдельно от примеси CD3–CD4⁺ моноцитов.^{10–12}

3. ПРИНЦИП МЕТОДА _____

При добавлении цельной крови к реагентам меченные флуорохромом антитела в реагенте специфично связываются с поверхностными антигенами лейкоцитов. 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. Реагенты MultiTEST активируют флуоресценцию, делая возможным гейтирование популяции лимфоцитов для прямой флуоресценции^{10–12} с целью снижения количества проникновений нелизированных или ядросодержащих эритроцитов в гейт.

При использовании пробирок TruCOUNT определенный объем образца окрашивается непосредственно в пробирке 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 MultiSET™, абсолютные значения рассчитываются программой. При анализе данных вручную с использованием такого программного обеспечения, как CellQuest™, необходимо разделить количество подсчитанных положительных клеток на количество подсчитанных частиц, а затем умножить на концентрацию частиц TruCOUNT.

4. РЕАГЕНТ _____

В комплекте реагент, достаточный для проведения 50 анализов

BD MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4 reagent поставляется в 1 мл буферном солевом растворе с 0,1 % азида натрия. Он содержит меченные FITC-CD3, клон SK7,^{13–15} меченные PE CD8, клон SK1,^{16, 17} меченные PerCP CD45, клон 2D1 (HLе-1),¹⁸ и меченные APC CD4, клон SK3.^{16, 17, 19}

CD3 выявляет Т-лимфоциты и распознает эпсилон-цель комплекса рецептора антигена CD3/Т-клеточного антигена (ТкР).²⁰ Этот комплекс состоит из не менее чем шести белков с молекулярной массой от 20 до 30 килодальтон (кДа).²¹ Антиген, распознаваемый антителами к CD3, нековалентно связан с α/β или γ/δ субъединицами ТкР (от 70 до 90 кДа).²²

CD8 выявляет Т-супрессоры/Т-киллеры и распознает антиген, экспрессирующийся на субъединицах массой 32 кДа α бимолекулярного комплекса, образованного сшивкой дисульфидными связями.²³ Цитоплазматический домен субъединицы α антигена CD8 связан с протеинтирозин-киназой p56^{lck}.²⁴ CD8 взаимодействует с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, что приводит к увеличению адгезии между CD8⁺ Т-лимфоцитами и клетками-мишенями.^{25–27} Связывание антигена CD8 с молекулами ГКГС класса I усиливают активацию покоящихся Т-лимфоцитов.^{25–27}

CD45 распознает антиген человеческих лейкоцитов молекулярной массой от 180 до 220 кДа, относящийся к семейству общих лейкоцитарных антигенов (LCA).²⁸

CD4 определяет Т-хелперы/Т-индукторы и распознает антиген CD4 молекулярной массой 59 кДа,²⁹ который взаимодействует с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) II класса и является первичным рецептором для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).^{30, 31} Цитоплазматическая порция антигена связана с протеинтирозин-киназой p56^{lck}.²⁴

Антитела CD3, CD8, CD45 и CD4 состоят из тяжелых цепей γ_1 мыши и легких каппа-цепей.

Пробирки TtuCOUNT содержат лиофилизированный осадок флуоресцентных частиц и предназначены для одноразового использования. В каждом пакете TtuCOUNT содержится 25 пробирок, чего достаточно для проведения 25 анализов.

Меры предосторожности

1. Для диагностики *in vitro*.
2. Не использовать реагент, если наблюдаются какие-либо изменения внешнего вида. Осадок или обесцвечивание свидетельствуют о нестабильности или порче.
3. Хотя реагент антител содержит 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). Хранить в недоступном для детей месте (S2). Держать вдали от пищи, напитков и корма для животных (S13). Использовать подходящую защитную одежду (S36). При попадании внутрь немедленно обратитесь 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.

4. **ОСТОРОЖНО!** Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат

обращению как с потенциальным источником инфицирования^{32, 33} 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.³⁴

5. Необходим лизирующий раствор FACS™ Lysing Solution*, содержащий диэтиленгликоль и формальдегид. Предупреждения см. в инструкции-вкладыше упаковки FACS Lysing Solution.
6. Для получения правильных результатов при использовании пробирок TruCOUNT критически важным является внесение точного объема крови. Откалибруйте пипетки, чтобы добавлять ровно 50 мкл образца. Компания BD предлагает электронные пипетки, работающие в режиме обратного пипетирования (см. № 7 в п. «Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект»). Если эта или аналогичные пипетки не применяются, используйте технику обратного пипетирования (см. краткое описание в п. «Обратное пипетирование» в разделе 7). Для получения дополнительной информации см. инструкцию производителя пипетки.
7. Содержание частиц в пробирках 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 TruCOUNT. Не используйте пробирки из разных партий при проведении одного анализа.

8. Пробирки TruCOUNT разработаны для использования со специфичной процедурой лизирования без промывки. Для сбора данных не пытайтесь преодолеть порог прямого светорассеяния (FSC).

Хранение и обращение

1. Хранить реагент при температуре 2—8 °С. Не использовать после истечения срока годности, указанного на этикетке.
2. Реагент не замораживать и не подвергать воздействию прямого солнечного света при хранении или инкубации с клетками. Пробирка с реагентом должна оставаться сухой.
3. Пробирки TruCOUNT следует хранить в оригинальном пакете из полимерной пленки при температуре 2—25 °С. Во избежание конденсации пакет следует открывать только после достижения им комнатной температуры и тщательно запечатывать его сразу после извлечения пробирки. Проверяйте влагопоглотитель при каждом открывании пакета. Если влагопоглотитель изменил цвет с голубого на бледно-лиловый, утилизируйте оставшиеся пробирки. Использовать пробирки необходимо не позднее чем через 1 час после извлечения из пленочного пакета. Не используйте пробирки после даты истечения срока годности, которая указана на упаковке.

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

5. ПРИБОР

MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4 reagent и пробирки TruCOUNT предназначены для использования с проточным цитометром, оборудованном соответствующими техническими средствами и программным обеспечением. Компания BD рекомендует проточные цитометры FACSCalibur™ или FACSort™. Однако при использовании других платформ также можно получить результаты. Проточный цитометр должен быть оснащен лазерами 635 нм и 488 нм и быть способен определять рассеяние света (прямое и боковое) и четырехцветную флуоресценцию с излучением, обнаруживаемом в четырех диапазонах: 515—545 нм, 562—607 нм, > 650 нм и 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.

Компания BD рекомендует использовать частицы CalIBRITE™ Beads и программное обеспечение FACSComp™ версии 4,0 или более поздней для настройки напряжений фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсации флуоресценции, а также проверки чувствительности прибора перед использованием. Операторам проточных цитометров производства других компаний (кроме BD) следует обратиться к инструкции производителя по настройке четырехцветного иммунофенотипирования.

Компанией BD разработано программное обеспечение, такое как MultiSET, автоматически рассчитывающее абсолютные значения при использовании пробирок 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 ОБРАЗЦА

Отберите кровь путем венепункции с соблюдением правил асептики^{35,36} в стерильную вакуумную пробирку для отбора крови VACUTAINER® с EDTA-K₃ (фиолетовая крышка). MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4 reagent и пробирки TruCOUNT проверены как с жидкой, так и с сухой формой EDTA-K₃.

Для анализа необходимоне менее 100 мкл цельной крови. Соблюдайте инструкции производителя пробирки для отбора крови в отношении минимального объема крови, который необходимо отобрать, чтобы обеспечить нужное разбавление образца, особенно при определении абсолютного значения с использованием частиц 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. пункт «Линейность» в разделе 11 «Рабочие характеристики») или чтобы посчитать абсолютные значения по процентным долям.

Антикоагулированную кровь, хранимую при комнатной температуре (20—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, взятые у пациентов, получающих иммунодепрессанты, могут давать плохое разрешение.³⁷ Блестные

клетки могут исказить результаты анализа. Следует отказаться от использования гемолизированных образцов.

7. ПРОЦЕДУРА _____

Поставляемый реагент

- MultiTEST CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC reagent (BD кат. № 342417) или
- MultiTEST CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC reagent с пробирками TruCOUNT (BD кат. № 342447)

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект

1. Частицы CaliBRITE 3 и APC (BD кат. №№ 340486 и 340487 соответственно).
2. FACS Lysing Solution (10-кратный), 100 мл (BD кат. № 349202). Инструкции по разбавлению и предостережения см. в инструкции-вкладыше к *FACS Lysing Solution*.
3. Чистая вода (дистиллированная или деионизированная).
4. Пробирки для отбора крови VACUTAINER с EDTA-K₃ или эквивалентные.
5. Одноразовые полистироловые пробирки Falcon™ с крышками 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные (если не используются пробирки TruCOUNT).
6. Вихревая мешалка «вортекс».
7. Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD, кат. № 646539, или эквивалентный).
8. Дозатор масс или пипеточный дозатор для дозирования 450 мкл FACS Lysing Solution.

9. Проточная жидкость (FACSFlow™, BD кат. № 342003, или эквивалентная).

10. Контрольные образцы TruCOUNT (BD кат. № 340335) необходимы при использовании пробирок TruCOUNT.

11. Контрольный образец лизируемой цельной крови (имеется в продаже).

Окрашивание клеток

Лизируйте эритроциты после окрашивания, используя разведенный (однократный) FACS Lysing Solution. Защищайте пробирки от прямого воздействия света. Выполняйте процедуру при комнатной температуре (20—25 °С). См. «Меры предосторожности» в разделе 4 и «Мешающие факторы» в разделе 6.

Обратное пипетирование

Для получения правильных результатов при использовании пробирок TruCOUNT критически важным является внесение точного объема крови. Если электронная пипетка BD или ее аналог, предназначенный для добавления в пробирки точного количества крови, не применяются, используйте технику обратного пипетирования. В данной методике используются два упора пипетки.

- При обратном пипетировании кнопка нажимается до второго упора. После отпускания кнопки образец поступает в наконечник с избытком. Точный объем образца выливается путем нажатия кнопки до первого упора, при этом избыток образца остается в наконечнике.

Окрашивание

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

Для абсолютных величин вместо пробирки 12 x 75 мм пометьте пробирку TruCOUNT.

ПРИМЕЧАНИЕ. Перед использованием следует удостовериться в том, что осадок частиц TruCOUNT интактен и находится под металлической сеточкой на дне пробирки. Если это не так, утилизируйте пробирку TruCOUNT и используйте новую.

2. Внесите 20 мкл MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4 reagent на дно пробирки.

При использовании пробирок TruCOUNT, вносите реагент чуть выше сеточки из нержавеющей стали. Не прикасайтесь к осадку.

3. Внесите 50 мкл хорошо перемешанной, антикоагулированной цельной крови на дно пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ. Не допускайте растекания крови по стенкам пробирки. Если цельная кровь останется на стенке пробирки, она не окрасится реагентом.

При использовании пробирок TruCOUNT точность внесения очень важна. Используйте технику обратного пипетирования для внесения образца на стенку пробирки чуть выше сеточки.

4. Закройте пробирку и аккуратно перемешайте в вортексе. Инкубируйте 15 минут в темноте при комнатной температуре (20—25 °C).
5. Добавьте в пробирку 450 мкл однократного FACS Lysing Solution.

6. Закройте пробирку и аккуратно перемешайте в вортексе. Инкубируйте 15 минут в темноте при комнатной температуре (20—25 °C). Образец готов для анализа на проточном цитометре.

Проточная цитометрия

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

Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки в вортексе на малой скорости.³⁸ При использовании FACS Loader перемешайте содержимое пробирок в вортексе непосредственно перед их размещением в подставки загрузчика. Соберите и проанализируйте данные в режиме списка с использованием программного обеспечения MultiSET или CellQuest. Прежде чем анализировать образцы, отрегулируйте порог для минимизации дегриса и убедитесь, что целевые популяции включены в анализ.

Контроль качества

Ежедневно выполняйте анализ контрольного образца здорового взрослого донора или коммерческого контрольного образца цельной крови для оптимизации настроек прибора и в целях контроля качества системы.³⁶

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, 2 и 3 изображены репрезентативные данные гематологически нормального образца взрослого человека, окрашенного CD3/CD8/CD45/CD4 в пробирке TruCOUNT.

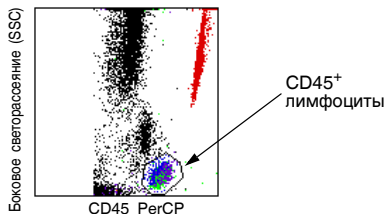


Рис. 1. Идентификация лимфоцитов на точечной диаграмме CD45 и SSC

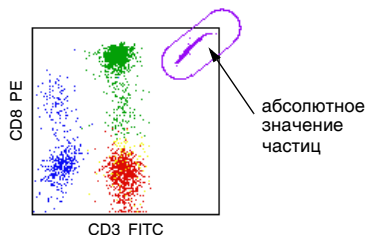


Рис. 2. Частота событий абсолютного значения частиц TruCOUNT на точечной диаграмме CD3 и CD8

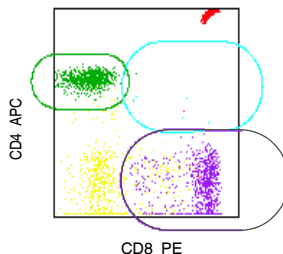


Рис. 3. Идентификация частоты событий CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺ на точечной диаграмме CD8 и CD4

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 MultiSET абсолютные значения рассчитываются автоматически.

При анализе данных вручную с использованием программного обеспечения CellQuest или других программ необходимо разделить количество подсчитанных положительных клеток на количество подсчитанных частиц, а затем умножить на концентрацию частиц TruCOUNT.

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

* Это значение указано на этикетке пакета с пробирками TruCOUNT и в различных партиях может отличаться.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ _____

1. Лаборатории должны устанавливать свои собственные диапазоны нормальных значений параметров MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4 reagent, на которые могут оказывать влияние пол пациента, его возраст и процедура подготовки образца. Расовая принадлежность пациента³⁹ и индивидуальные вариации экспрессии эпитопов⁴⁰ также могут оказывать влияние, хотя в настоящее время недостаточно данных для подтверждения данного факта. Для определения нормального диапазона следует знать возраст, пол, клиническую картину заболевания и расовую принадлежность пациентов.⁴¹ Указанные диапазоны нормальных значений несут только информационный характер.
2. MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4 reagent не проверен для использования с жидкими антикоагулянтами гепарином и цитратным антикоагулянтом с декстрозой при расчете абсолютных показателей с использованием пробирок TruCOUNT.
3. MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4 reagent не предназначен для скрининга образцов на наличие лейкозных клеток или для использования с образцами для фенотипирования пациентов, больных лейкемией.
4. Абсолютные значения различны в лабораториях, использующих оборудование разных производителей.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ _____

Нормальные диапазоны

Диапазоны нормальных значений для CD3/CD8/CD45/CD4, приведенные в табл. 1, были определены в трех клинических исследовательских центрах США.

Субъектами выступали взрослые здоровые люди в возрасте от 18 до 65 лет. Дополнительная информация о диапазонах нормальных значений указана в пункте 1 раздела «Ограничения».

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

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

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ _____

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

Точность

Подсчет процентных долей и абсолютных значений субпопуляции лимфоцитов, произведенный с использованием MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4 в пробирках TruCOUNT, сравнивался с результатами, полученными с использованием TriTEST™ CD3/CD4/CD45 или CD3/CD8/CD45 в пробирках 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. 2, показывает практически эквивалентные результаты.

Воспроизводимость для одного образца

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 (или) коэффициенты вариации (CV) для процентных долей и абсолютных значений субпопуляций, больших чем 100 клеток/мкл, приведены в табл. 3 и 4.

Табл. 2. Регрессионный анализ

Субпопуляция	n	R	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	Диапазон
Т-хелперы/Т-индукторы (%)	124	0,998	0,996	-0,434	1—62
Т-супрессоры/Т-киллеры (%)	124	0,997	1,018	-0,383	13—78
Всего Т-лимфоцитов (%)	124	0,995	1,002	0,254	22—90
Т-хелперы/Т-индукторы (клеток/мкл)	124	0,982	1,015	-7,692	93—1904
Т-супрессоры/Т-киллеры (клеток/мкл)	124	0,988	1,001	2494	132—2229
Общее количество Т-лимфоцитов (клеток/мкл)	124	0,981	1,028	-20,451	189—2987

Табл. 3. Воспроизводимость для одного образца в отношении процентных долей субпопуляций

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

Табл. 4. Воспроизводимость для одного образца в отношении абсолютных значений субпопуляций

Субпопуляция	n	Среднее значение (клеток/мкл)	SD	%CV
Т-хелперы/Т-индукторы (клеток/мкл)	38	565,2	62,92	7,02
Т-супрессоры/Т-киллеры (клеток/мкл)	46	687,8	54,02	6,79
Общее количество Т-лимфоцитов (клеток/мкл)	46	1219,9	101,57	6,34

Стабильность

Было проведено исследование стабильности рабочих характеристик реагента MultiTEST в пробирках TruCOUNT. В процессе исследования измерялись: 1) изменения, связанные с хранением цельной крови перед окрашиванием; 2) изменения по прошествии времени между окрашиванием и сбором данных; 3) совмещение 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 анализом 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.

Перекрестная реактивность

Антитела к CD8 реагируют с NK-лимфоцитами,⁴² а также с Т-супрессорами/Т-киллерами. Антитела к CD4 реагируют с моноцитами, а также с Т-хелперами/Т-индукторами.¹⁹

Линейность

Линейность оценивалась для концентрации лейкоцитов в пределах от $0,2 \times 10^3$ до $29,7 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл и концентрации лимфоцитов в пределах от $0,1 \times 10^3$ до $9,0 \times 10^3$ лимфоцитов/мкл. Линейность полученных результатов наблюдалась в пределах диапазона CD3⁺CD4⁺, диапазона CD3⁺CD8⁺ и диапазона CD3⁺.

ГАРАНТИЯ

Для продаваемых согласно данным условиям продуктов гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке или маркировке продукта на момент доставки заказчику. Не существует никаких гарантий, явных или подразумеваемых, выходящих за рамки описания на этикетке продукта. Вся ответственность компании BD ограничивается либо заменой продуктов, либо возмещением цены покупки. BD не несет ответственности за повреждение имущества, получение травм или экономический ущерб, вызванные продуктом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut.* 1989;59:200-206.
2. Nicholson JKA. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch Pathol 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. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.

* Данные доступны в BD Biosciences.

14. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti-Leu-4 antibody. *J Immunol.* 1983;131:536-539.
15. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bemstein ID, eds. *Leucocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:259-288.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP, et al. Identification of a putative second T cell receptor. *Nature.* 1986;322:145-149.
22. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:629-662.
23. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
24. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Monoclonal antibodies to the CD4 and CD8 antigens precipitate variable amounts of CD4/CD8-associated p56^{lck} activity. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
25. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 1989;86:10044-10048.
26. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman SF. Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *J Immunol.* 1987;139:678-682.
27. Eichmann K, Jönsson J-I, Falk I, Emmrich F. Effective activation of resting mouse T lymphocytes by cross-linking submitogenic concentrations of the T cell antigen receptor with either Lyt-2 or L3T4. *Eur J Immunol.* 1987;17:643-650.
28. 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.
29. Organizing Committee of the Fourth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. Appendix A: CD guide. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press Inc; 1989:1074-1093.
30. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 1984;312:763-767.
31. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell.* 1986;47:333-348.
32. 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.
33. *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue: Tentative Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.
34. 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.
35. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document H3-A3.
36. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes: Tentative Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992. NCCLS document H42-T.

37. 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.
38. 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.
39. 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 (1):33-37.
40. Angadi CV. Lack of Leu-3a epitope on T-helper (CD4) lymphocytes. *J Clin Lab Anal*. 1990;4:193-195.
41. *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992. NCCLS document C28-A.
42. 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.