



BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR

Reagent

50 тестов на флакон — кат. №: 337603

Для определения удельного веса активированных Т-лимфоцитов в периферической крови человека

Не для использования при типировании тканей

6/2010

23-13710-01



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 Simultest™ CD3/Anti-HLA-DR представляет собой реагент для прямой иммунофлуоресценции с двухцветной меткой для подсчета удельного веса зрелых активированных Т-лимфоцитов в цельной лизированной крови человека.

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). Т-лимфоциты принимают участие в антиген-специфическом клеточно-опосредованном иммунном ответе и регулируют секрецию иммуноглобулина В-лимфоцитами. В свою очередь Т-лимфоциты также можно разделить на основе их функциональных свойств на хелперы/индукторы, супрессоры/цитотоксические и активированные Т-лимфоциты.

Клиническое применение*

Повышение содержания активированных Т-лимфоцитов (HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов) может наблюдаться при состояниях, сопровождающихся активацией иммунной системы,¹ которые могут быть вызваны инфекцией^{2–5} или указывать на угрозу отторжения имплантата.⁶ Фактическую причину активации иммунной системы необходимо подтвердить результатами дополнительных клинических и лабораторных анализов.

* Не во всех исследованиях, представленных в данном разделе, использовались реагенты BD Biosciences.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

При добавлении реагентов с моноклональными антителами к цельной крови человека, меченные флуорохромом антитела специфически связываются с антигенами на поверхности лейкоцитов. Моноклональные антитела могут использоваться для идентификации субпопуляций лимфоцитов.

Аликвота окрашенного образца пациента вносится в проточный цитометр и проходит в узкой струе через луч лазера. Луч лазера вызывает флуоресценцию окрашенных клеток, а излучаемый свет измеряется и обрабатывается проточным цитометром.

4. РЕАГЕНТ

Реагента в комплекте достаточно для проведения 50 анализов

Каждый BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent, количества которого достаточно для выполнения 50 анализов, поставляется в 1 мл буферизованного солевого раствора с желатином и 0,1 % азида натрия. Он содержит меченные флуоресцеин изотиоцианатом (FITC) антитела CD3, клон SK7,⁷⁻¹⁰ для определения Т-лимфоцитов, и меченные фикоэритрином* (PE)-антитела Anti-HLA-DR, клон L243,¹¹ для определения HLA-DR⁺CD3⁺ популяции активированных Т-лимфоцитов. Соотношение флуоресцеина к белку (F:P) в реагентах BD Biosciences с моноклональными антителами IgG составляет от 2 до 5. Соотношение F:P для CD3 FITC оптимизировано в соответствии с его назначением.

Антитело CD3 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁. CD3 вступает в реакцию с эпсилон-цепью

комплекса рецепторов антигена CD3/антигена Т-клетки (ТкР).¹² Этот комплекс состоит из не менее чем шести белков с молекулярной массой от 20 до 30 килодальтон (кДа).¹³ Антиген, распознаваемый антителами к CD3, нековалентно связан с α/β или γ/δ субъединицами ТкР (от 70 до 90 кДа).¹⁴

Антитело Anti-HLA-DR состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG_{2a}. Антиген HLA-DR (лейкоцитарный антиген человека, D-связанный) представляет собой молекулу главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса II. Этот антиген является трансмембранным гликопротеином, состоящим из α - и β -субъединиц с молекулярной массой 36 и 27 кДа соответственно.^{11, 15}

Меры предосторожности

- Для диагностики *in vitro*.
- Хранение при температуре от 2 до 8 °C обеспечивает стабильность реагента на основе антител до даты истечения срока годности, которая указана на этикетке. Не использовать после истечения срока годности.
- Реагент на основе антител нельзя замораживать или подвергать прямому воздействию света при хранении или инкубации с клетками. Не подвергайте флакон с реагентом воздействию влаги.
- Изменение внешнего вида реагента, например, выпадение осадка или обезвреживание, свидетельствует о нестабильности или старении. В таком случае реагент использовать не следует.
- Реагент на основе антител в качестве консерванта содержит азид натрия, однако следует принимать меры предосторожности во избежание микробного загрязнения, которое

* Патент США № 4 520 110, Европейский патент № 76 695, патент Канады № 1 179 942.

может приводить к получению неверных результатов.

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 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!** Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{16, 17} 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.

5. ПРИБОР

BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent разработан для применения с проточным цитометром BD FACSTM, оснащенным соответствующим аппаратным и программным обеспечением компьютера, а также электронной системой

гейтирования. Проточный цитометр должен быть оснащен компонентами, необходимыми для детектирования двухцветной флуоресценции, прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. BD Biosciences рекомендует использовать программное обеспечение BD Simulset™ версии 2.5 или более поздней для сбора и анализа данных.

Все рабочие характеристики были получены с использованием проточного цитометра BD FACScan™ и проверены на цитометре BD FACStrak™. Другие системы могут иметь другие характеристики и подлежат проверке пользователем.

Для получения информации относительно использования данного реагента в исследовательских целях с применением других приборов BD FACS обратитесь к представителю компании BD.

6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Произведите забор крови из вены с соблюдением правил асептики^{18, 19} в стерильную вакуумную пробирку с EDTA-K₃ (бледно-лиловая крышка) BD Vacutainer™. Для данной процедуры необходимо не менее 1 мл цельной крови. Для получения оптимальных результатов кровь необходимо выполнять окрашивание образцов крови не позднее, чем через 6 часов после венепункции. Кровь с антикоагулянтом хранить перед окрашиванием не дольше 6 часов при комнатной температуре (от 20 до 25 °C). Охлаждение образцов крови перед окрашиванием может приводить к получению искаженных результатов.

Перед окрашиванием необходимо получить результаты подсчета лейкоцитов и дифференциального подсчета

лейкоцитов для того же образца цельной крови. Диапазон приемлемых концентраций лейкоцитов составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ клеток/мкл. Образцы с содержанием лейкоцитов свыше $9,8 \times 10^3$ клеток/мкл необходимо разбавить однократным фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1 % азида натрия. Для анализа образцов с результатом подсчета ниже $3,5 \times 10^3$ клеток/мкл может потребоваться большее количество крови, а также выполнение процедуры разделения для повышения концентрации клеток.

Мешающие факторы

Не следует использовать ранее зафиксированные и хранившиеся образцы. Охлаждение образцов цельной крови перед окрашиванием может приводить к получению искаженных результатов. Для получения оптимальных результатов необходимо выполнять окрашивание образцов крови не позднее, чем через 6 часов после венопункции. Образцы, полученные от пациентов, принимающих иммунодепрессанты могут привести к низкому разрешению.²⁰ Присутствие бластных клеток, а также ядродержащих или нелизированных эритроцитов может отрицательно влиять на результаты анализа. Не использовать гемолизированные образцы. Минимальное количество отбираемой крови указано в рекомендациях производителя пробирки для забора образца.

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

7. ПРОЦЕДУРА

Поставляемый реагент

См. комплект поставки реагента и предостережения в разделе 4 «Реагенты».

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект

- Реагент BD Simultest Leucogate™ (CD45/CD14), 1 мл (BD кат. № 342408).

Инструкции по определению гейта лимфоцитов см. в инструкции-вкладыше упаковки *BD Simultest Leucogate*, а также в *Руководстве пользователя программного обеспечения BD Simulset*. Хранить при температуре от 2 до 8 °C.

- Контроль BD Simultest control γ_1/γ_2a (IgG₁ FITC/IgG_{2a} PE, оба избирательно реагируют с гемоцианином фиссуреллы), 1 мл (BD кат. № 342409).

Хранить при температуре от 2 до 8 °C.

- Лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution* (10-кратный) (BD кат. № 349202).

Инструкции по разбавлению и предупреждения см. на вкладыше к продукту.

- Калибровочные частицы BD Calibrite™ Beads (BD кат. № 349502).

Подробная информация по использованию приведена в инструкции-вкладыше упаковки *BD Calibrite Beads*.

- Пробирки для забора крови BD Vacutainer с EDTA-K₃ или эквивалентные.

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

- Одноразовые полистироловые пробирки с крышками BD Falcon™ 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные.
- Вихревая мешалка «вортекс».
- Низкоскоростная центрифуга (минимальная скорость 200 x g) с горизонтальным ротором и планшетами для пробирок 12 x 75 мм.
- Вакуумный аспиратор с ловушкой.
- Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD; BD кат. № 646539, или эквивалентные).
- Промывочный фосфатно-солевой буфер (PBS) (однократный) (модифицированный раствор Дьюлбеко, pH $7,2 \pm 0,2$; 0,01 моль/л PO_4 и 0,15 моль/л NaCl).²¹

Этот реагент не содержит кальций, магний, феноловый красный и азид натрия. Перед использованием PBS необходимо отфильтровать через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Хранить при температуре от 2 до 8 °C.

- PBS, как указано выше, с 0,1 % азида натрия.
- Проточная жидкость.
- Параформальдегид (1 %) для фиксации клеток.

Растворите 1 г параформальдегида в 100 мл свежеприготовленного PBS, осторожно нагревая смесь до температуры не выше 56 °C в вытяжном шкафу. Доведите pH до $7,4 \pm 0,2$ с помощью NaOH (0,1 моль/л) или HCl (0,1 моль/л). Отфильтруйте через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Хранить в стеклянной таре при температуре от 2 до 8 °C.

ОСТОРОЖНО! Формальдегид вреден при вдыхании и при контакте с кожей и токсичен при попадании внутрь (R20/21, 25). Он обладает раздражающим действием на глаза и

кожу (R36/38). В случае попадания в глаза немедленно промойте их большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью (S26). При продолжительном воздействии возможно развитие злокачественных новообразований. При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Возможный риск необратимых эффектов (R68). Может вызывать сенсибилизацию при контакте с кожей (R43). При использовании не принимать пищу и напитки (S20).

- Чистая вода (дистиллированная или деионизированная).

Окрашивание и фиксация клеток

Образцы цельной крови вначале следует окрасить с помощью реагента BD Simultest Leucogate (пробирка А), контроля BD Vacutainer (пробирка В), и BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent* (пробирка С). После окрашивания выполняется лизирование эритроцитов с помощью разведенного (однократного) BD FACS Lysing Solution. Защищайте пробирки от попадания прямого света. Выполнять процедуру следует при комнатной температуре (от 20 до 25 °C), используя реагенты с такой же температурой. См. пункт «Меры предосторожности» раздела 4 «Реагент».

1. Промаркируйте по три пробирки 12 x 75 мм для каждого образца (А, В и С).

На каждой пробирке также укажите идентификационный номер образца.

* Комбинация и методика применения BD Simultest Leucogate, BD Simultest контроля γ_1/γ_{2a} и BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR защищена патентами США № 4 987 086 и 5 064 616.

2. Внесите 20 мкл реагента BD Simultest Leucogate в пробирку А, 20 мкл контроля BD Simultest в пробирку В и 20 мкл BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent в пробирку С.
3. На дно каждой из трех промаркированных пробирок с образцом аккуратно внесите с помощью дозатора с новым наконечником 100 мкл тщательно перемешанной цельной крови с антикоагулянтом.

Рекомендуемая концентрация лейкоцитов составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ клеток/мкл. Тщательно перемешайте содержимое пробирок в течение 3 секунд на вортексе с низкой скоростью, и инкубируйте 15—30 минут при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).

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

4. Разведите 10-кратный BD FACS Lysing Solution до однократного, следуя указаниям, приведенным в инструкции-вкладыше.

Добавьте в каждую пробирку по 2 мл однократного BD FACS Lysing Solution комнатной температуры (от 20 до 25 °C). Сразу же тщательно перемешайте содержимое на вортексе на низких оборотах в течение 3 секунд и инкубируйте в течение 10—12 минут при комнатной температуре (от 20 до 25 °C) в темноте. Не инкубируйте дольше 12 минут.

NOTE Не допускайте излишне продолжительного воздействия

лизирующих реагентов на клетки, так как это может привести к разрушению лейкоцитов.

5. Сразу после инкубации центрифугируйте пробирки при $300 \times g$ и комнатной температуре (от 20 до 25 °C) в течение 5 минут.
6. Удалите супернатант, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости, чтобы не повредить осадок.
7. Тщательно перемешайте на вортексе на низких оборотах для ресуспендирования клеточного осадка в остаточной жидкости, после чего добавьте в каждую пробирку 2 мл PBS с 0,1 % азида натрия.

Тщательно перемешайте в течение 3 секунд на вортексе с низкой скоростью. Центрифугируйте при $200 \times g$ и комнатной температуре (от 20 до 25 °C) в течение 5 минут.

8. Удалите супернатант, оставив в пробирке приблизительно 50 мкл жидкости, чтобы не повредить осадок.
9. Тщательно перемешайте на вортексе с низкой скоростью, чтобы вновь суспендировать клеточный осадок в остаточной жидкости, после чего добавьте в каждую пробирку по 0,5 мл 1 % раствора параформальдегида.

Тщательно перемешайте в течение 3 секунд на вортексе с низкой скоростью. Удостоверьтесь в том, что клетки тщательно перемешались с фиксирующим раствором.

Теперь клетки готовы для анализа в проточном цитометре. Наденьте крышки или покройте подготовленные пробирки и храните их в темноте при температуре от 2 до 8 °C до анализа в проточном цитометре. Анализ фиксированных клеток необходимо

выполнить не позднее чем через 24 часа после окрашивания. Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки на вортексе на малой скорости.²¹

Проточная цитометрия

Следуйте инструкциям компании BD Biosciences по проведению анализа двухцветной проточной цитометрии, приведенным на веб-сайте www.bdbiosciences.com.

Контроль качества

Для получения оптимальных результатов компания BD рекомендует с помощью BD Calibrite Beads и программного обеспечения BD AutoCOMP™ перед выполнением анализа с использованием BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent в этих приборах настроить напряжения фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсацию флуоресценции, а также проверить чувствительность проточных цитометров BD FACScan или BD FACStrak.

Компания BD рекомендует ежедневно анализировать в качестве контроля образец крови здорового взрослого донора с целью оптимизации настроек прибора и контроля качества работы системы. Правильные результаты анализа пациента с нормальными гематологическими характеристиками представлены на рис. 1.

Отрицательный контроль BD Simultest анализируется с каждым образцом пациента с целью установки меток «флуоресценция-1» (FL1) и «флуоресценция-2» (FL2) между кластерами отрицательных и положительных результатов окрашивания лимфоцитов, а также для выявления антиген-неспецифического окрашивания антител, которое указывает на

недоверенность результатов анализа образцов пациента.

Выполните визуальный осмотр точечной диаграммы, полученной для BD Simultest контрольной пробы В. При выявлении диффузного негативного кластера, выходящего за пределы диапазона интенсивности FL2, возможна неправильная настройка метки, а результаты могут быть сомнительными.

Программа BD Simulset автоматически проанализирует данные и отобразит соответствующее количество предупреждающих сообщений об ошибках. Список возможных сообщений приведен в *Руководстве пользователя программного обеспечения BD Simulset*. Для проверки точечных диаграмм, полученных для каждого образца, с целью оценки качества полученных данных пользуйтесь следующими критериями:

- Оператор должен отклонить результаты, если для анализа нормального контроля отображается одно или несколько следующих сообщений об ошибках: «no separation between cellular populations» (клеточные популяции не разделены); «too few lymphocytes (less than 500)» (недостаточное количество лимфоцитов, менее 500); «excessive RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 10 %)» (чрезмерная контаминация эритроцитами/ядросодержащими эритроцитами и дебрисом, более 10 %); «excessive monocyte (greater than 3 %)» (чрезмерная контаминация гейта моноцитами, более 3 %) или «granulocyte (greater than 6 %) contamination of the lymphocyte gate» (чрезмерная контаминация гейта лимфоцитов гранулоцитами, более 6 %).
- В случае отсутствия каких-либо явных причин неудачи анализа нормального

контроля следует выполнить окрашивание и анализ другого образца нормального контроля и повторить процедуру окрашивания для всех последующих образцов.

- Образцы с ядросодержащими эритроцитами могут содержать слишком много дебриса вследствие неполного лизирования ядросодержащих эритроцитов BD FACS Lysing Solution. Избыток дебриса также может наблюдаться при анализе образцов крови пациентов с определенными гематологическими заболеваниями, при которых лизирование эритроцитов затруднено, например при миелофиброзе или сфероцитозе. Ядросодержащие эритроциты будут подсчитаны как дебрис и, если уровень дебриса превысит 10 %, программа отметит образец флагом «too many nonlymphs in gate» (чрезмерное количество нелимфоцитарных элементов в гейте) и результаты этого анализа будут необходимо отклонить.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ _____

Пересчет удельного веса лимфоцитов

Если выполнен пересчет удельного веса лимфоцитов, субпопуляция CD3⁺HLA-DR⁺ лимфоцитов будет представлена как удельный вес лимфоцитов в пределах гейта анализа лимфоцитов. Если пересчет не выполнен, результаты будут представлены как процентные доли гейтированного количества событий.

Дифференциальный подсчет трех фракций

В лизированной цельной крови с помощью реагента BD Simultest Leucogate (пробирка A) можно определять

моноциты, лимфоциты и гранулоциты как процентную долю в общем количестве лейкоцитов. Программа BD Simulset автоматически выполняет дифференциальный подсчет трех фракций. Примеры распечатки данных приведены в *Руководстве пользователя программного обеспечения BD Simulset*.

NOTE Получаемые программой BD Simulset результаты дифференциального подсчета следует использовать исключительно для сравнения с результатами независимого подсчета количества лейкоцитов в целях контроля качества. Их не следует использовать вместо результатов независимого лабораторного дифференциального подсчета количества лейкоцитов в картах пациентов или вводить в программу BD Simulset для получения абсолютных количеств.

Абсолютные количества

Абсолютное количество клеток можно рассчитать, если из результатов независимого дифференциального подсчета лейкоцитов с помощью стандартного лабораторного метода получены значения количества и процентной доли лимфоцитов. Инструкции по расчету абсолютных значений приведены в *Руководстве пользователя программного обеспечения BD Simulset*.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Лаборатории должны установить свои собственные диапазоны нормальных значений для параметров BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent, на которые могут оказывать влияние пол пациента, его возраст и процедура подготовки образца. Расовая принадлежность пациента также может оказывать влияние, хотя нет достаточных данных, подтверждающих этот факт. Возраст, пол, клиническое состояние и расовая принадлежность пациентов должны быть учтены при определении диапазона нормальных значений.
- Результаты, полученные с помощью BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent, должны использоваться в комплексе с другой информацией, полученной при клиническом обследовании и дополнительных независимых диагностических процедурах.
- BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent не предназначен для скрининга образцов на наличие лейкозных клеток или для использования с образцами для фенотипирования пациентов, больных лейкозией. Присутствие бластных клеток может помешать правильно установить гейт анализа лимфоцитов с помощью реагента BD Simultest Leucogate. Программа отметит такой образец флагом и не будет печатать его результаты.
- Абсолютные значения субпопуляций лимфоцитов в разных лабораториях могут отличаться вследствие применения различных методов определения количества лейкоцитов и/или дифференциального подсчета лейкоцитов.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Субпопуляции лейкоцитов

Популяция активированных Т-лимфоцитов представлена на рисунке 1 в квадранте 2 (Q2) для пробирки С и в *Руководстве пользователя программного обеспечения BD Simulset*. Клинически значимые результаты приводятся в отчете лечащего врача.

На рисунке 1 представлены результаты анализа образца, полученного у пациента без патологии крови и окрашенного с помощью реагента BD Simultest Leucogate (пробирка А), контроля BD Simultest (пробирка В) и BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent (пробирка С). Реагент BD Simultest Leucogate применяется для уменьшения количества дебриса, моноцитов и гранулоцитов в гейте, представленном под пробиркой А. Точечные диаграммы FL1 (ось абсцисс) в сравнении с FL2 (ось ординат) представлены для пробирок В и С.

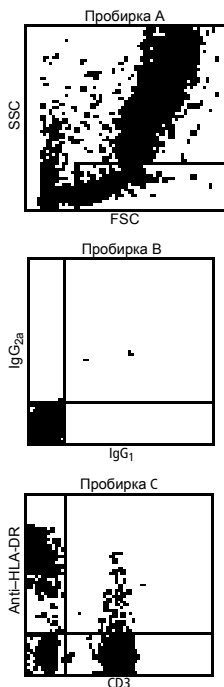


Рис. 1. BD FACScan образец лизированной цельной крови

Компания BD установила диапазоны нормальных значений для параметров, определяемых с помощью BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent, исследовав с использованием проточного цитометра BD FACScan образцы здоровых доноров мужского и женского пола в шести медицинских учреждениях (пять медицинских центров в Европе и один в США). Ожидаемые диапазоны нормальных значений для

активированных Т-лимфоцитов в лизированной цельной крови представлены в таблице 1.²²

Табл. 1. Репрезентативные нормальные диапазоны для параметров BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent при исследовании крови взрослых доноров с нормальными гематологическими характеристиками, выраженные как удельный вес в общем количестве лимфоцитов, т. е. в пересчете, (обобщенные данные из 6 клинических центров)

Параметр	Пол	Возраст	n	Среднее значение	95 % диапазон
Активированные Т-лимфоциты	мужской	18—40	58	9,4	3,5—
	мужской	41—70	67	11,0	20,6
	женский	18—40	64	7,8	3,6—
	женский	40—70	44	9,1	25,9
					2,8—17,3
					4,2—17,2

Нормальные диапазоны для взрослых неприменимы для детей.

При определении диапазонов нормальных значений возможно следует учитывать расовую принадлежность,²³ однако компания BD не имеет для этого достаточных данных.

NOTE Ожидаемые нормальные значения могут очень сильно отличаться в зависимости от пола, возраста и расовой принадлежности пациента. В связи с этими отличиями, каждая лаборатория должна рассчитать собственные нормальные диапазоны для всех параметров.

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ _____

Рабочие характеристики BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent были установлены в результате испытаний в лабораториях BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния, и/или в одном или нескольких клинических центрах.

Воспроизводимость результатов в рамках образца

В таблице 2 представлена воспроизводимость внутри выборки как для нормальных, так и для патологических образцов.

Табл. 2. Воспроизводимость внутри выборки для параметров BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent (5 здоровых доноров, 5 доноров с патологией), как удельный вес лимфоцитов (в пересчете)

Доноры	Параметр	Среднее значение	SD	CV	df
Норма	Активированные Т-лимфоциты	6,4	1,5	24,5	15
Патология	Активированные Т-лимфоциты	38,9	1,6	4,3	15

Воспроизводимость результатов между приборами

В таблице 3 представлена воспроизводимость результатов между приборами.

Табл. 3. Воспроизводимость результатов между приборами для параметров BD Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent (10 здоровых доноров, 3 прибора) как удельный вес лимфоцитов (в пересчете)

Параметр	Среднее значение	SD	CV	df
Активированные Т-лимфоциты	11,8	1,56	14,09	20

Воспроизводимость результатов между лабораториями

О воспроизводимости результатов между лабораториями свидетельствует возможность объединения нормальных диапазонов параметров, определяемых с помощью Simultest CD3/Anti-HLA-DR reagent (таблица 1 на page 10).

Сравнение CD3/Anti-HLA-DR и сравнимого метода

В таблице 4 представлены обобщенные результаты.

Табл. 4. Сравнение BD Simultest™ IMK Plus и сравнимого метода^а с использованием лизированной цельной крови и проточного цитометра BD FACScan

Параметр	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	R	n ^б	Диапазон данных (%)
Активированные Т-лимфоциты ^б	1,06	0,34	0,92	27	4—51

а. В сравнении с набором для оценки иммунологических показателей BD Simultest™.

б. Включает нормальные и патологические образцы.

Стабильность окрашенных клеточных образцов

Компания BD рекомендует анализировать образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

Перекрестная реактивность

Антитело Anti-HLA-DR реагирует с моноцитами/макрофагами, активированными NK-лимфоцитами, человеческими клетками-предшественниками, В-лимфоцитами и активированными Т-лимфоцитами. 2, 4, 24—27

Линейность и выход

Линейность результатов ожидается в диапазоне от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл.

ГАРАНТИЯ

Для продаваемого согласно данным условиям продукта гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке 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. Legendre CM, Schiffrin A, Weitzner G, Colle E, Guttman RD. Two-color flow cytometry analysis of activated T-lymphocyte subsets in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes*. 1988;37:792-795.
2. Tomkinson B, Wagner D, Nelson D, Sullivan J. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J Immunol*. 1987;139:3802-3807.
3. Bogner J, Matuschke B, Hienrich B, Schreiber M, Nerl C, Goebel F. Expansion of activated T lymphocytes (CD3⁺HLA-DR⁺) detectable in early stages of HIV-1 infection. *Klin Wochenschr*. 1990;68:393-396.
4. Levacher M, Tallet S, Dazza M, Dournon E, Rouveix B, Pocidallo J. T activation marker evaluation in ARC patients treated with AZT: comparison with CD4⁺ lymphocyte count in non-progressors and progressors towards AIDS. *Clin Exp Immunol*. 1990;81:177-182.
5. Vanham G, Kestens L, Gigase P, et al. Evidence for circulating activated cytotoxic T cells in HIV-infected subjects before the onset of opportunistic infections. *Clin Exp Immunol*. 1990;82:3-9.
6. Bishop GA, Hall BM, Duggin GG, Horvath JS, Sheil AGR, Tiller DJ. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Internat*. 1986;29:708-717.
7. 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;1:3-30.
8. 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.
9. 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.
10. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:259-288.
11. Lampson LA, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol*. 1980;125:293-299.

12. 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.
13. Brenner MB, Groh V, Porcelli SA, et al. Structure and distribution of the human γ/δ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
14. 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.
15. Brodsky FM. A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes. *Immunogenetics*. 1984;19:179-194.
16. *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.
17. 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.
18. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes: Approved Guideline*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H42-A.
19. *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.
20. 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.
21. 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.
22. Reichert T, DeBruyère M, Deneyes V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
23. 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.
24. Terstappen LWMM, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol*. 1990;48:138-148.
25. Warnke RA, Levy R. Detection of T and B antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem*. 1980;28:771-776.
26. Stites DP, Casavant CH, McHugh TM, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986;38:161-177.
27. Edwards JA, Durant BM, Jones DB, Evans PR, Smith JL. Differential expression of HLA class II antigens in fetal human spleen: relationship of HLA-DP, DQ, and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol*. 1985;137:490-497.