



Simultest CD3/CD4 Reagent

50 тестов на флакон — кат. № 342405

Для определения удельного веса Т-хелперов/Т-индукторов в периферической крови человека

5/2010

23-13749-01



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/CD4 представляет собой набор реагентов для определения процентных долей зрелых Т-хелперов/Т-индукторов в лизированной цельной крови человека методом прямой двухцветной иммунофлуоресценции.

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. Т-лимфоциты подразделяются, в зависимости от их функциональных свойств, на Т-хелперы/Т-индукторы и Т-супрессоры/Т-киллеры.

Клиническое применение*

Т-хелперы/Т-индукторы — это субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3⁺), экспрессирующих антиген CD4⁺. Процентные доли Т-хелперов/Т-индукторов (CD3⁺CD4⁺) используются для оценки и мониторинга некоторых форм иммунодефицита^{1—3} и аутоиммунных

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

заболеваний.^{4, 5} Определение долей Т-хелперов/Т-индукторов используется при мониторинге состояния лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).^{*6} При прогрессировании инфекции пациенты с ВИЧ, как правило, показывают устойчивое снижение количества Т-хелперов/Т-индукторов.⁸

ПРИМЕЧАНИЕ. Simultest CD3/CD4 reagent позволяет идентифицировать и подсчитать количество Т-хелперов/Т-индукторов отдельно от примеси CD3-CD4⁺ моноцитов.⁸

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.

* Для определения процентной доли CD4⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов Центрами по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) рекомендуется использовать двухцветную комбинацию реагентов, содержащую антитела к антигенам CD3 и CD4.⁷

4. РЕАГЕНТ

Реагента в комплекте достаточно для проведения 50 анализов

Simultest CD3/CD4 reagent, количества которого достаточно для выполнения 50 анализов, поставляется в 1 мл буферного солевого раствора, содержащего желатин и 0,1 % азида натрия. Он содержит меченные флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) антитела CD3, клон SK7,^{9—12} и меченные фикоэритрином (PE) антитела[†] CD4, клон SK3,^{13, 14} для определения популяции Т-хелперов/Т-индукторов (CD3⁺CD4⁺). Соотношение флуоресцеин/белок (F:P) для реагентов BD на основе моноклональных антител класса 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 эpsilon-цепью комплекса рецепторов антигена CD3/антигена Т-клетки (ТкР).¹⁵ Этот комплекс состоит из не менее чем шести белков с молекулярной массой от 20 до 30 килодальтон (кДа).¹⁶ Антиген, распознаваемый антителами к CD3, нековалентно связан с α/β или γ/δ ТкР (от 70 до 90 кДа).¹⁷

Антитело CD4 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного

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

IgG₁. Антитела к CD4 распознают антиген CD4, который взаимодействует с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) II класса и является первичным рецептором для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).^{18, 19}

Меры предосторожности

1. Для диагностики *in vitro*.
2. 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.
3. Реагент на основе антител нельзя замораживать или подвергать прямому воздействию света при хранении или инкубации с клетками. Не подвергайте флакон с реагентом воздействию влаги.
4. Изменение внешнего вида реагента, например, выпадение осадка или обесцвечивание, свидетельствует о нестабильности или порче. В таком случае реагент использовать не следует.
5. Реагент на основе антител в качестве консерванта содержит азид натрия, однако следует принимать меры предосторожности во избежание микробного загрязнения, которое 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 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 объемом воды во избежание осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно возникновение взрывоопасных условий.

6. **ОСТОРОЖНО!** Все образцы, взятые у пациентов, и контактирующие с ними материалы подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования и требуют утилизации с соблюдением надлежащих мер предосторожности в соответствии с федеральными, региональными и местными нормативами. Не выполнять пипетирование ртом. Не допускать контакта образцов с кожей и слизистыми оболочками.

5. ПРИБОР

Simultest CD3/CD4 reagent предназначен для использования с проточным цитометром BD FACSTM, оснащенным соответствующим аппаратным и программным

обеспечением, а также электронной системой гейтирования. Проточный цитометр должен быть оснащен компонентами, необходимыми для детектирования двухцветной флуоресценции, прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Компания Becton Dickinson рекомендует использовать для сбора и анализа данных программное обеспечение SimulSET™ версии 2.5 или более поздней.

Все рабочие характеристики были получены с использованием проточного цитометра BD FACScan™ и проверены с использованием проточного цитометра 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 FACS обратитесь в центр поддержки клиентов компании Becton Dickinson.

6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Отберите кровь посредством венепункции^{20, 21} с соблюдением правил асептики в стерильную вакуумную пробирку VACUTAINER® с EDTA-K₃ (этилендиаминтетрауксусной кислотой) (бледно-лиловая крышка). Для анализа необходимо не менее 1 мл цельной крови. Для получения оптимальных результатов 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 °С). 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 $9,4 \times 10^3$ клеток/мкл. Если результат подсчета превышает $9,4 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл, необходимо разбавить образец однократным фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1 % азида натрия. Для анализа образцов с результатом подсчета ниже $3,5 \times 10^3$ лейкоцитов/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 венепункции. Образцы, полученные от пациентов, принимающих иммунодепрессанты, могут привести к низкому разрешению.²² Присутствие

бластных клеток, а также ядросодержащих или незлизованных эритроцитов может отрицательно влиять на результаты анализа. Не использовать гемолизированные образцы. Минимальное количество отбираемой крови указано в рекомендациях производителя пробирки для забора образца.

ВНИМАНИЕ! 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 «Реагент».

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект

1. Реагент Simultest LeucoGATE™ (CD45/CD14) reagent, 1 мл, (BD кат. № 342408). Информацию относительно определения гейта анализа лимфоцитов см. в инструкции-вкладыше к реагенту *Simultest LeucoGATE* и в *Руководстве пользователя программного обеспечения SimulSET*. Хранить при температуре от 2 до 8 °С.
2. Контроль 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 °С.

3. Лизирующий раствор FACS Lysing Solution* (10-кратный) (BD кат. № 349202). Инструкции по разбавлению и предупреждения см. на вкладыше к продукту.
4. Частицы CaliBRITE™ beads (BD кат. № 349502). Подробная информация по использованию приведена в инструкции-вкладыше упаковки *CaliBRITE Beads*.
5. Пробирки для забора крови VACUTAINER с EDTA-K₃ или эквивалентные.
6. Одноразовые полистироловые пробирки Falcon™ с крышками 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные.
7. Вихревая мешалка «вортекс».
8. Низкоскоростная центрифуга (минимальная скорость 200 x g) с горизонтальным ротором и вставками для пробирок 12 x 75 мм.
9. Вакуумный аспиратор с ловушкой.
10. Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD Electronic Pipette, BD кат. № 646539, или эквивалентная).
11. Фосфатно-солевой буфер (PBS), однократный (модифицированный раствор Дюльбекко, pH 7,2 ± 0,2; 0,01 моль/л PO₄; и 0,15 моль/л NaCl).¹⁸ Этот реагент не содержит кальция, магния, фенолового

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

красного или азида натрия. Перед использованием PBS необходимо отфильтровать через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Хранить при температуре от 2 до 8 °С.

12. PBS, в соответствии с параграфом выше, с 0,1 % азида натрия.
13. Проточная жидкость.
14. Параформальдегид (1 %) для фиксации клеток. Растворите 1 г параформальдегида в 100 мл свежеприготовленного PBS, осторожно нагревая смесь до температуры не выше 56 °С 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 °С.

ОСТОРОЖНО! 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. Возможный риск необратимых эффектов (R68). Может вызывать сенсибилизацию при контакте с кожей (R43). Хранить в закрытом, недоступном для детей месте (S1/2). Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки (S36/37). При попадании внутрь немедленно обратитесь за

медицинской помощью и покажите упаковку или этикетку (S46). Утилизировать согласно федеральным, государственным и местным постановлениям.

15. Чистая вода (дистиллированная или деионизированная).

Окрашивание и фиксация клеток

Образцы цельной крови вначале окрашиваются реагентами Simultest LeucoGATE (пробирка А), Simultest control (пробирка В) и Simultest CD3/CD4* reagent (пробирка С). После окрашивания образцы обрабатываются разбавленным (однократным) FACS Lysing Solution для лизиса эритроцитов. Защищайте пробирки от попадания прямого света. Выполнять процедуру следует при комнатной температуре (от 20 до 25 °С), 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 пациента (А, В и С). На каждой пробирке также укажите идентификационный номер образца.
2. Внесите в пробирку А 20 мкл Simultest LeucoGATE, в пробирку В — 20 мкл Simultest control, в пробирку С — 20 мкл Simultest CD3/CD4 reagent.

* Комбинация и методика применения реагентов Simultest LeucoGATE, Simultest control γ_1/γ_{2a} и Simultest CD3/CD4 reagent защищена патентами США №№ 4 987 086 и 5 064 616.

- Используя для каждой пробирки новый наконечник дозатора, аккуратно добавьте на дно каждой из трех промаркированных пробирок по 100 мкл хорошо перемешанной цельной крови с антикоагулянтом. Рекомендуемая концентрация лейкоцитов составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,4 \times 10^3$ клеток/мкл. Тщательно перемешайте содержимое пробирок, встряхивая их в течение 3 секунд на вортексе с низкой скоростью, и инкубируйте 15—30 минут при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).

ПРИМЕЧАНИЕ. 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.

- Добавьте в каждую пробирку по 2 мл однократного 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.

ПРИМЕЧАНИЕ. Не допускайте излишне продолжительного воздействия лизирующих реагентов на

клетки, так как это может привести к разрушению лейкоцитов.

- Сразу после инкубации центрифугируйте пробирки в течение 5 минут при $300 \times g$ и комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
- Аспирируйте супернатант, оставив в каждой пробирке приблизительно 50 мкл жидкости, чтобы не повредить осадок.
- 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 в течение 5 минут при $200 \times g$ и комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
- Аспирируйте супернатант, оставив в каждой пробирке приблизительно 50 мкл жидкости, чтобы не повредить осадок.
- 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.

10. 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.²³

Проточная цитометрия

Следуйте инструкциям компании BD по проведению анализа методом двухцветной проточной цитометрии.

Контроль качества

Для получения оптимальных результатов компания BD рекомендует перед использованием Simultest CD3/CD4 reagent для выполнения анализа в проточном цитометре FACScan или FACStrak установить напряжения фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), настроить компенсацию флуоресценции и проверить чувствительность прибора с помощью CaliBRITE beads и программного обеспечения AutoCOMP™ software.

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.

Simultest control анализируется с каждым образцом пациента с целью установки маркеров флуоресценции 1 (FL1) и 2 (FL2) между кластерами отрицательных и положительных результатов окрашивания лимфоцитов, а также для выявления неспецифического окрашивания, которое указывает на недостоверность результатов анализа образцов пациента.

Выполните визуальный осмотр точечной диаграммы, полученной для пробирки В с Simultest control. Если кластер отрицательных результатов рассеян и выходит за пределы диапазона интенсивности FL2, возможна неправильная установка маркера и результаты могут быть сомнительными.

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

1. Оператор должен отклонить результаты, если для анализа нормального контроля

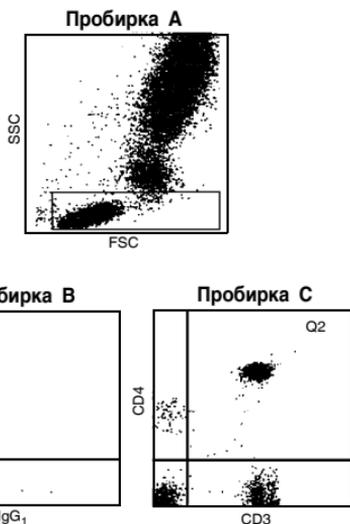


Рис. 1. Результат анализа образцов лизированной цельной крови пациента с нормальными гематологическими характеристиками, окрашенных реагентами Simultest LeucoGATE (пробирка А), Simultest control (пробирка В) и Simultest CD3/CD4 reagent (пробирка С), в приборе FACScan. Реагент Simultest LeucoGATE применялся 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

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 моноцитами, более 3 %) или «granulocyte (greater than 6%) contamination of the lymphocyte gate» (контаминация лимфоцитарного гейта гранулоцитами, более 6 %).

2. 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.

3. Образцы с ядросодержащими эритроцитами могут содержать слишком много дебриса вследствие неполного лизирования ядросодержащих эритроцитов FACScan 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.

4. Различия в количестве гейтированных событий между

пробирками должно быть меньше или равно 500 для всех пробирок панели, за исключением пробирки с Simultest LeucoGATE (пробирка А). (Однако, если есть отклонения в контрольной пробирке с Simultest control, результаты анализа панели сомнительны).

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Пересчет удельного веса лимфоцитов

Если выполнен пересчет удельного веса лимфоцитов, субпопуляция CD3⁺CD4⁺ 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 Simultest LeucoGATE (пробирка А) можно определять процентную долю моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов в общем количестве лейкоцитов. Программа SimulSET автоматически выполняет дифференциальный подсчет трех фракций. Примеры распечатки данных приведены в *Руководстве пользователя программного обеспечения SimulSET*.

ПРИМЕЧАНИЕ. Получаемые программой 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 SimulSET для получения абсолютных значений.

Абсолютные значения

Абсолютные значения клеток можно рассчитать, если количество лейкоцитов и удельный вес лимфоцитов были получены с помощью стандартной лабораторной процедуры из лейкоцитарной формулы, рассчитанной в независимой лаборатории. Инструкции по выполнению подсчета абсолютных значений приведены в *Руководстве пользователя программного обеспечения SimulSET*.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Лаборатории должны установить свои собственные диапазоны нормальных значений для параметров Simultest CD3/CD4 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.
2. Результаты, полученные с помощью Simultest CD3/CD4 reagent, должны

использоваться в комплексе с другой информацией, полученной при клиническом обследовании и дополнительных независимых диагностических процедурах.

3. Simultest CD3/CD4 reagent не предназначен для скрининга образцов на наличие лейкозных клеток или для использования с образцами для фенотипирования пациентов, больных лейкемией. Присутствие бластных клеток может помешать правильно установить гейт анализа лимфоцитов с помощью Simultest LeucoGATE. Программа отметит такой образец флагом и не будет печатать его результаты.

4. Значения абсолютных количеств субпопуляций лимфоцитов в разных лабораториях могут отличаться вследствие применения различных методов определения количеств лейкоцитов и/или лейкоцитарной формулы.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Субпопуляции лейкоцитов

Популяция Т-хелперов/Т-индукторов представлена на рисунке 1 в квадранте 2 (Q2) для пробирки С и в *Руководстве пользователя программного обеспечения SimulSET*. Клинически значимые результаты приводятся в отчете лечащего врача.

Компания BD изучала диапазоны нормальных значений для параметров

Simultest CD3/CD4 reagent с использованием образцов 159 здоровых субъектов мужского и женского пола с помощью проточного цитометра FACScan в трех исследовательских центрах (два клинических центра в США и центре BD в Сан Хосе, штат Калифорния). Ожидаемые диапазоны нормальных значений для Т-хелперов/Т-индукторов в лизированной цельной крови представлены в таблице 1.²⁴

Табл. 1. Репрезентативные нормальные диапазоны Параметры, определяемые Simultest CD3/CD4 reagent в крови взрослых доноров с нормальными гематологическими характеристиками, как общая процентная доля гейтированных лимфоцитов (в пересчете).
Обобщенные данные из трех медицинских центров

Параметр	Пол	Возраст	N	Среднее значение	95 % диапазон
Т-хелперы/ Т-индукторы	Мужской	18—70	84	43	29—57
	Женский	18—70	75	46	31—61

Нормальные диапазоны для взрослых неприменимы для детей.

При определении диапазонов нормальных значений возможно следует учитывать расовую принадлежность,²⁵ однако компания BD не имеет для этого достаточных данных.

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 Simultest CD3/CD4 reagent утверждены путем тестирования в двух клинических центрах, расположенных в США, и лабораториях BD, расположенных в Сан Хосе, штат Калифорния.

Воспроизводимость результатов в рамках образца

В таблице 2 представлены средние значения воспроизводимости результатов в рамках образца для образцов здоровых и больных доноров.

Табл. 2. Воспроизводимость результатов в рамках образца для параметров, определяемых Simultest CD3/CD4 reagent (шесть здоровых и четыре больных доноров); процентные доли лимфоцитов (в пересчете)

Доноры	Параметр	Среднее значение	SD в пределах одного окрашивания	df	SD между окрашиваниями	df
Норма	T-хелперы/T-индукторы	45,8	1,1	12	1,5	10,4
Патология	T-хелперы/T-индукторы	31,6	1,1	8	1,1	9,9

Табл. 3. Воспроизводимость результатов между приборами для параметров, определяемых Simultest CD3/CD4 reagent (пять здоровых донора и два прибора); процентные доли лимфоцитов (в пересчете)

Параметр	Прибор	Среднее значение	SD	CV
T-хелперы/T-индукторы	1	38,6	1,04	2,68
	2	38,1	0,88	2,32

Воспроизводимость результатов между приборами

В таблице 3 представлены данные воспроизводимости результатов между приборами.

Воспроизводимость результатов между лабораториями

О воспроизводимости результатов между лабораториями свидетельствует возможность объединения нормальных диапазонов параметров, определяемых с помощью Simultest CD3/CD4 reagent (таблица 1).

Сравнение Simultest CD3/CD4 с другим методом

Обзор результатов представлен в таблице 4.

Табл. 4. Сравнение Simultest CD3/CD4 reagent с другим методом^а
(панели реагентов Simultest IMK Plus Reagent Panel
и Simultest IMK-Lymphocyte Reagent Panel^б)

Параметр	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	R	N	Диапазон данных (%)	
					IMK Plus	IMK-Lymphocyte
T-хелперы/T-индукторы	0,95	-0,27	0,96	84	8—68	8—65

- а. Данные были получены на цитометре FACScan с помощью реагентов Simultest IMK-Lymphocyte, в которые входят LeucoGATE, Control $\gamma\delta/\gamma_{2a}$ и CD3/CD4. Использовалась программа Simultest IMK-Lymphocyte.
- б. Для разграничения подгрупп истинных T-хелперов/T-индукторов и истинных T-супрессоров/T-киллеров применялись два метода, отличавшихся тем, что в наборе Simultest IMK Plus kit используются антитела к CD4/CD8 для идентификации T-хелперов/T-индукторов и T-супрессоров/T-киллеров (включая моноциты), а в наборе Simultest IMK-Lymphocyte kit — антитела к CD3/CD4 и CD3/CD8.

Стабильность окрашенных клеточных образцов

Компания BD рекомендует проводить анализ не позднее чем через 24 часа после окрашивания.

Перекрестная реактивность

Антитела к CD4 реагируют с моноцитами, а также T-хелперами/T-индукторами.²⁶

Линейность и выход

Линейность результатов ожидается в диапазоне от $3,5 \times 10^3$ до $9,4 \times 10^3$ 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. Schmidt R. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
2. Nicholson J. 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 J. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Medicine*. 1982;13:403.
4. Cohen S, Weetman A. Activated interstitial and intraepithelial thyroid lymphocytes in autoimmune thyroid disease. *Acta Endocr*. 1988;119:161-166.
5. Smolen J, Chused T, Leiserson W, Reeves J, Alling D, Steinberg A. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
6. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi J. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS*. 1990;4:479-497.
7. Centers for Disease Control. Guidelines for the performance of CD4⁺ T-cell determination in persons with human immunodeficiency virus infection. *MMWR*. 1992;41(No. RR-8):1-17.
8. Giorgi J, Hultin L. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:55-62.
9. Haynes B. Summary of T cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York: Springer-Verlag; 1986:3-30.
10. Ledbetter J, Evans R, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good R, Herzenberg L. 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.
11. Kan E, Wang C, Wang L, Evans R. Non-covalently 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.
12. Knowles R. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York: Springer-Verlag; 1986:259-288.
13. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman S, eds. *Leukocyte Typing*. Berlin: Springer-Verlag; 1984:25-60.
14. Evans R, Wall D, Platsoucas C, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: Inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to the TH₂ antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(1):544-548.
15. Van Dongen J, Krissansen G, Wolvers-Tettero I, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
16. Brenner M, Groh V, Porcelli A, et al. Plenary papers: Structure and distribution of the human $\gamma\delta$ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
17. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: A dynamic protein ensemble. *Annual Rev Immunol*. 1988;(6)629.
18. Maddon P, Dalgleish A, McDougal J, Clapham P, Weiss R, 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.
19. Dalgleish A, Beverly P, Clapham P, Crawford D, Greaves M, Weiss R. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS virus. *Nature*. December 1984;312:763-767.

20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3-A3)*. Villanova, PA: The National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes; Tentative Guideline. (H42-T)*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992.
22. Giorgi J. Lymphocyte subset measurements: Significance in clinical medicine. In: Rose N, Friedman H, Fahey J, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
23. Jackson A, Warner N. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose N, Friedman H, Fahey J, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
24. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991;60:190-208.
25. Prince H, Hirji K, Waldbeser L, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier L. Influence of racial background on the distribution of T cell subsets and Leu-11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diag Immunol*. 1985;3:33-37.
26. Wood F, Warner N, Wamke R. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol*. 1983;131(1):212-216.