



BD Simultest CD4/CD8 Reagent

50 тестов на флакон — кат. № 342407

Для определения хелперов/индукторов и киллеров/супрессоров в периферической крови человека

6/2010

23-13728-01



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™ CD4/CD8 представляет собой реагент для прямой иммунофлуоресценции с двухцветной меткой для подсчета удельного веса зрелых хелперов/индукторов (CD4⁺) и супрессоров/киллеров (CD8⁺) в цельной лизированной крови человека. Также возможно определение иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺).

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

Клиническое применение*

Определение удельного веса CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов используется в мониторинге состояния иммунной системы у пациентов с иммунодефицитом, аутоиммунными заболеваниями или иммунными реакциями. Относительный удельный вес CD4⁺ субпопуляции снижен, а относительный удельный вес CD8⁺ повышен у многих пациентов с врожденным или приобретенным иммунодефицитом,¹ например, при тяжелом комбинированном иммунодефиците (ТКИД)¹ и синдроме приобретенного иммунодефицита (СПИД).^{†, 2}

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

Удельный вес супрессоров/киллеров может выходить за пределы нормального диапазона значений при некоторых аутоиммунных заболеваниях⁴ и отдельных иммунных реакциях, таких как острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ)⁵ и отторжение трансплантата.⁶ Относительный удельный вес популяции CD8⁺ лимфоцитов часто снижается при активной системной красной волчанке (СКВ), но его повышение может отмечаться у больных СКВ, получающих терапию глюкокортикоидами.⁷

Отношение CD4⁺/CD8⁺ (хелперы/супрессоры), определяемое как отношение количества CD4-положительных лимфоцитов, окрашиваемых флуоресцеина изотиоцианатом (FITC), к количеству CD8-положительных лимфоцитов, окрашиваемых фикоэритрином (PE), использовалось для оценки иммунного статуса пациентов с наличием или подозрением на развитие аутоиммунных заболеваний^{4, 8} или иммунодефицита.^{2, 7} В большинстве случаев иммунодефицитных состояний относительный удельный вес хелперов снижается, а супрессоров — повышается. В таких состояниях также может отмечаться Т-клеточная лимфопения.^{9, 10} Кроме того, это соотношение использовалось для мониторинга начала острой РТПХ у пациентов, перенесших трансплантацию костного мозга.⁵ Наряду с тем что иммунорегуляторный индекс (соотношение CD4⁺/CD8⁺, хелперы/супрессоры) является полезным индикатором, его использование имеет ряд специфических ограничений.

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

BD Simultest CD4/CD8 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 FITC антитела CD4, клон SK3,^{11, 12} для определения популяции хелперов/индукторов и меченные PE антитела CD8, клон SK1,^{10, 11} для определения популяции супрессоров/киллеров. Соотношение флуоресцеина к белку (F:P) в реагентах BD с моноклональными антителами IgG составляет от 2 до 5. Соотношение F:P для CD4 FITC оптимизировано в соответствии с его назначением.

Антитело CD4 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁. Антитело к CD4 распознает антиген CD4, который взаимодействует с молекулами белков главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса II и является основным рецептором для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).^{13, 14}

† Для определения удельного веса CD8⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов Центрами по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) рекомендуется использовать двухцветную комбинацию реагентов, содержащую антитела CD3 и CD8, а для определения CD4⁺ Т-лимфоцитов у таких пациентов — двухцветную комбинацию реагентов, содержащую антитела CD3 и CD4.³

Антитело CD8 состоит из тяжелых цепей и легких капша-цепей мышиного IgG₁. Антиген CD8 присутствует на субпопуляции Т-супрессоров/Т-киллеров человека^{12, 15} а также субпопуляции NK-лимфоцитов.¹⁶ Антиген CD8 экспрессируется на α-субъединице массой 32-килодалтон (кДа) бимолекулярного комплекса, образованного сшивкой дисульфидными связями.¹⁷ Цитоплазматический домен α-субъединицы антигена CD8 связан с протеинтирозинкиназой p56-lck.^{18, 19}

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 подвергать флакон с реагентом воздействию влаги.
- Изменение внешнего вида реагента, например, выпадение осадка или обесцвечивание, 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 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 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 образование взрывоопасных условий.

ОСТОРОЖНО! Работать со всеми образцами пациентов и материалами, контактировавшими с ними, следует так, как будто они представляют опасность в плане передачи инфекций, а утилизировать с соблюдением всех мер предосторожности в соответствии с федеральными, государственными и местными постановлениями. Не выполнять пипетирование ртом. Не допускать контакта образцов с кожей и слизистыми оболочками.

5. ПРИБОР

BD Simulset CD4/CD8 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 BD рекомендует использовать программное обеспечение BD Simulset™ software версии 2.5 или более поздней для сбора и анализа данных.

Все рабочие характеристики были получены с использованием проточного цитометра BD FACScan™ и проверены с использованием проточного цитометра BD FACStrak™. Другие системы могут

иметь другие характеристики и подлежат проверке пользователем.

Для получения информации по использованию данного реагента в исследовательских целях на других приборах торговой марки BD FACS обратитесь в центр поддержки клиентов компании BD.

6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Отберите кровь посредством венепункции^{20, 21} с соблюдением правил асептики в стерильную вакуумную пробирку BD Vacutainer® с EDTA-K₃ (бледно-лиловая крышка). Для данной процедуры необходимо не менее 1 мл цельной крови. Для получения оптимальных результатов кровь необходимо окрасить не позднее чем через 6 часов после венепункции. Кровь с антикоагулянтом можно 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 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, использовании и утилизации всех образцов крови человека, а также реагентов, потенциально обладающих канцерогенным действием, необходимо соблюдать соответствующие меры предосторожности.

7. ПРОЦЕДУРА

Поставляемый реагент

См. «Поставляемый реагент» и «Меры предосторожности» в разделе 4 «Реагент».

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки

- Реагент BD Simulstest Leucogate™ (CD45/CD14) reagent, 1 мл, (BD кат. № 342408). Инструкции по определению гейта лимфоцитов см. в инструкции-вкладыше упаковки *BD Simulstest Leucogate*, а также в *Руководстве пользователя BD Simulset software*. Хранить при температуре от 2 до 8 °C.

- Контроль BD Simultest Control (IgG₁ FITC/IgG_{2a} PE) (оба избирательно реагируют с гемодианином 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. в инструкции-вкладыше упаковки.
- 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.
- 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 вставками для пробирок 12 x 75 мм.
- Вакуумный аспиратор с ловушкой.
- Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD Electronic Pipette, BD кат. № 646539), или эквивалентная.
- 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 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 в пункте 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 ± 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 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.

- Чистая вода (дистиллированная или деионизированная).

Окрашивание и фиксация клеток

Образцы цельной крови вначале окрашиваются реагентами BD Simultest Leucogate (пробирка А), BD Simultest Control (пробирка В) и BD Simultest CD4/CD8 reagent (пробирка С). После окрашивания образцы обрабатываются разбавленным (однократным) BD 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. «Меры предосторожности» в разделе 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 реагента BD Simultest Leucogate, в пробирку В — 20 мкл BD Simultest Control, в пробирку С — 20 мкл BD Simultest CD4/CD8 reagent.
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 антикоагулянтom. Рекомендуемая концентрация лейкоцитов составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ клеток/мкл. Тщательно перемешайте содержимое на вортексе на низких оборотах в течение 3 секунд и инкубируйте в течение 15—30 минут при комнатной температуре (от 20 до 25 °С).

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.

4. Добавьте в каждую пробирку по 2 мл однократного BD FACS Lysing Solution комнатной температуры (от 20 до 25 °С). 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 °С) 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.

5. Сразу после инкубации центрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 300 g и комнатной температуре (от 20 до 25 °С).
6. Аспирируйте супернатант, оставив в каждой 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 в течение 5 минут при 200 g и комнатной температуре (от 20 до 25 °С).
8. Аспирируйте супернатант, оставив в каждой 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.
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 BD Simultest CD4/CD8 reagent для выполнения анализа в проточном цитометре BD FACScan или BD FACStrak установить напряжения фотоумножителей, настроить компенсацию флуоресценции и проверить чувствительность прибора с помощью BD Calibrite beads и программного обеспечения BD AutoCOMP™ software или BD FACSCOMP™ 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.

Отрицательный контроль BD Simulset control 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 недостоверность результатов анализа образцов пациента.

Выполните визуальный осмотр точечной диаграммы, полученной для пробирки В с контролем BD Simulset Control. 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 BD Simulset software*. 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»

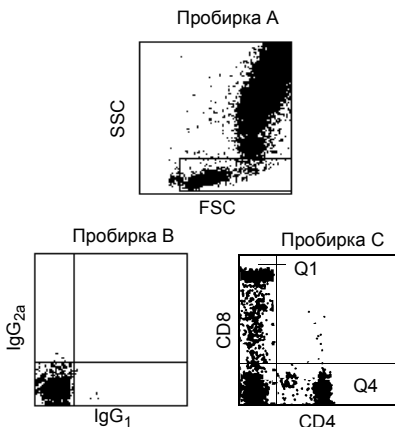


Рис. 1. Результат анализа образцов лизированной цельной крови пациента с нормальными гематологическими характеристиками, окрашенных реагентами BD Simultest Leucogate (пробирка А), BD Simultest Control (пробирка В) и BD Simultest CD4/CD8 reagent (пробирка С), и проанализированных в приборе BD FACScan. 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

(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»

(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 ядродержащими эритроцитами могут содержать слишком много дебриса вследствие неполного лизирования ядродержащих эритроцитов раствором 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. Ядродержащие 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 необходимо будет отклонить.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Пересчет удельного веса лимфоцитов

Если выполнен пересчет удельного веса лимфоцитов, субпопуляция CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов будет представлена как удельный вес лимфоцитов в пределах гейта анализа лимфоцитов. Если пересчет не выполнен, результаты будут представлены как процентные доли гейтированных событий.

Дифференциальный подсчет трех фракций

В лизированной цельной крови с помощью реагента BD Simultest Leucogate (пробирка А) можно определять удельный вес моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов в общем количестве лейкоцитов. BD Simulset software автоматически выполняет дифференциальный подсчет трех фракций. Примеры распечатки данных приведены в *Руководстве пользователя BD Simulset software*.

ПРИМЕЧАНИЕ. Получаемые BD Simulset software 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 BD Simulset software 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 BD Simulset software*.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Лаборатории должны установить свои собственные диапазоны нормальных значений для параметров BD Simultest CD4/CD8 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 CD4/CD8 reagent, должны использоваться в комплексе с другой информацией, полученной при клиническом обследовании и дополнительных независимых диагностических процедурах.
- BD Simultest CD4/CD8 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 хелперов/индукторов и популяция супрессоров/киллеров для пробирки С представлена на рисунке 1 в квадрантах 4 (Q4) и 1 (Q1) соответственно, а также в *Руководстве пользователя BD Simulset software*. Клинически значимые результаты приводятся в отчете лечащего врача.

Компания BD установила диапазоны нормальных значений для параметров, определяемых с помощью BD Simulset CD4/CD8 reagent, исследовав на проточном цитометре 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 соотношений хелперы/индукторы и супрессоры/киллеры в лизированной цельной крови представлены в табл. 1.²⁴

Нормальные диапазоны для взрослых неприменимы для детей.

Расовая принадлежность может оказывать влияние на определение нормальных диапазонов,²⁵ хотя компания BD не располагает достаточными данными для подтверждения этого факта.

ПРИМЕЧАНИЕ. 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.

Табл.1. Репрезентативные нормальные диапазоны параметров BD Simulset CD4/CD8 reagent при исследовании крови взрослых доноров с нормальными гематологическими характеристиками, выраженные как удельный вес в общем количестве лимфоцитов, т. е. в пересчете, (обобщенные данные трех клинических центров)

Параметр	Пол	Возраст	N	Среднее значение	95 % диапазон
Хелперы/индукторы	Муж.	18—40	77	39,9	27,3—52,5
	Муж.	41—70	84	43,9	28,5—59,2
	Жен.	18—40	85	44,0	31,4—56,7
	Жен.	41—70	85	48,9	34,0—63,8
Супрессоры/киллеры	Оба	18—70	304	33,4	18,9—47,9
Иммуно-регуляторный индекс	Муж.	18—40	77	1,2	0,6—2,2
	Муж.	41—70	84	1,5	0,6—3,0
	Жен.	18—40	85	1,3	0,7—2,3
	Жен.	41—70	58	1,7	0,8—3,3

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики BD Simulset CD4/CD8 reagent утверждены путем тестирования в одном клиническом центре, расположенном в США, и лабораториях BD, расположенных в Сан Хосе, штат Калифорния.

Воспроизводимость результатов в рамках образца

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

Воспроизводимость результатов между приборами

В табл. 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 BD Simultest CD4/CD8 reagent (табл. 1).

Сравнение BD Simultest CD4/CD8 с другим методом

Обзор результатов представлен в табл. 4.

Табл.2. Воспроизводимость результатов в рамках образца для параметров BD Simultest CD4/CD8 reagent (десять здоровых доноров и три прибора), выраженных как удельный вес в общем количестве лимфоцитов, т. е. в пересчете

Параметр	Среднее значение	SD	CV	df
Хелперы/индукторы	45,8	1,26	2,47	20
Супрессоры/киллеры	39,0	1,37	3,28	20
Иммунорегуляторный индекс	1,2	0,06	4,80	20

Табл.3. Воспроизводимость результатов между приборами для параметров BD Simultest CD4/CD8 reagent (пять здоровых и пять больных доноров), выраженных как удельный вес в общем количестве лимфоцитов, т. е. в пересчете

Доноры	N	Параметр	Среднее значение	SD	CV	df
Норма	5	Хелперы/индукторы	46,3	1,5	3,2	15
		Супрессоры/киллеры	34,8	1,3	3,6	15
		Иммунорегуляторный индекс	1,4	0,1	5,2	15
Патология	5	Хелперы/индукторы	18,8	2,1	12,2	15
		Супрессоры/киллеры	65,5	2,6	3,7	15
		Иммунорегуляторный индекс	0,3	0,04	13,4	15

Табл.4. Сравнение BD Simultest CD4/CD8 reagent с другим методом (набор BD Simultest Immune Monitoring [CD4/CD8]) с использованием лизированной цельной крови и проточного цитометра BD FACScan

Параметр	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	R	N ^a	Диапазон данных (%)
Хелперы/индукторы	1,16	-1,81	0,96	31	10—60
Супрессоры/киллеры	0,95	7,05	0,93	31	25—80
Иммунорегуляторный индекс	1,02	-0,02	0,98	31	0,125—2,0

a. Включает нормальные и патологические образцы.

Перекрестная реактивность

Антитела к CD4 реагируют с моноцитами, а также с Т-хелперами/Т-индукторами.²⁶ Антитела к CD8 реагируют с супрессорами/киллерами, а также с субпопуляцией NK-лимфоцитов.¹⁶

Стабильность окрашенных клеточных образцов

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

ГАРАНТИЯ

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

Для продаваемых согласно данным условиям продуктов ГАРАНТИРУЕТСЯ ТОЛЬКО СОБЛЮЖДЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И СОДЕРЖИМОГО, УКАЗАННЫХ НА ЭТИКЕТКЕ ИЛИ МАРКИРОВКЕ ПРОДУКТА НА МОМЕНТ ДОСТАВКИ ЗАКАЗЧИКУ. КОМПАНИЯ BD НАСТОЯЩИМ ОТВЕРГАЕТ ЛЮБЫЕ ДРУГИЕ ГАРАНТИИ, ЯВНЫЕ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫЕ, ВКЛЮЧАЯ ГАРАНТИИ КОММЕРЧЕСКОЙ ВЫГОДЫ, ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ КОНКРЕТНЫХ ЦЕЛЕЙ И НЕНАРУШЕНИЯ ПРАВ ТРЕТЬИХ СТОРОН. ВСЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ BD ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЛИБО ЗАМЕНОЙ ПРОДУКТОВ, ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ЦЕНЫ ПОКУПКИ. 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. Giorgi J, Hultin L. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10(4):55-61.
3. Centers for Disease Control. Guidelines for the performance of CD4⁺ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus infection. *MMWR*. 1992;41(No. RR-8):1-17.
4. 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.

5. Gratama J, Naipal A, Oljans P, et al. T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation: Early shifts in the ratio between T4⁺ and T8⁺ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1984;63(6):1416-1423.
6. Bishop G, Hall B, Duggin G, Horvath J, Sheil A, Tiller D. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Internat*. 1986;29:708-717.
7. Wolde-Mariam W, Peter J. Recent diagnostic advances in cellular immunology. *Diagnost Med*. 1984;7:25-32.
8. Smolen J, Chused T, Leiserson W, Reeves J, Alling D, Steinberg A. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: Correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
9. Ohno T, Kanoh T, Suzuki T, et al. Comparative analysis of lymphocyte phenotypes between carriers of human immunodeficiency virus (HIV) and adult patients with primary immunodeficiency using two-color immunofluorescence flow cytometry. *J Exp Med*. 1988;154:157.
10. Stites D, Casavant C, McHugh T, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986;38:161-177.
11. 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, Daussett J, Milstein C, Schlossman S, eds. *Leucocyte Typing*. Berlin: Springer-Verlag; 1984:25-60.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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*. February 1981;153:310-323.

16. Lanier L, Le A, Phillips J, Warner N, Babcock G. 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(4):1789-1796.
17. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
18. Rudd C, Burgess K, Barber E, Schlossman S. Monoclonal antibodies to the CD4 and CD8 antigens precipitate variable amounts of CD4/CD8-associated p56-lck activity. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
19. Gallagher P, Fazekas G, de St Groth B, Miller J. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:10044-10048.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3-A3)*. Villanova, PA: 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*; 3rd ed. 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 G, Warner N, Warnke R. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol.* 1983;131(1):212-216.