

BD Simultest™ IMK Plus

Кат. № 349217



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



6/2010

23-13687-03



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences

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

BD Biosciences

Поддержка клиентов в Европе

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



BENEX Limited

Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ирландия
Тел.: 353-61-472920
Факс: 353-61-472907

bdbiosciences.com

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	1
2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ	1
Клиническое применение	3
3. ПРИНЦИП МЕТОДА	5
4. РЕАГЕНТЫ	10
Комплект поставки реагентов в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов	10
Меры предосторожности	16
5. ПРИБОР	18
6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА	20
Мешающие факторы	20
7. ПРОЦЕДУРА	21
Поставляемые реагенты	21
Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки	21
Окрашивание и фиксация клеток	23
Проточная цитометрия	26
Контроль качества	29
8. РЕЗУЛЬТАТЫ	34
Расчет скорректированных количеств	34
Расчет абсолютных количеств	38
Дифференциальный подсчет трех фракций	39
9. ОГРАНИЧЕНИЯ	40
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ	46
Субпопуляции лейкоцитов	46
Абсолютные количества	49
11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	52
Воспроизводимость результатов в рамках образца	52
Воспроизводимость результатов между приборами	52

Воспроизводимость результатов между лабораториями	53
Сравнение Simultest IMK Plus с другими методами	53
Стабильность окрашенных клеточных образцов	53
Перекрестная реактивность	56
Линейность и выход	57
12. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ	58
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	62
ГАРАНТИЯ	68
ИНФОРМАЦИЯ О ПОДДЕРЖКЕ КЛИЕНТОВ	68

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов BD Simultest™ IMK Plus* предназначен для проведения прямой двухцветной иммунофлуоресценции с целью определения в лизированной цельной крови (LWB) человека процентных долей следующих зрелых (небластных) субпопуляций лимфоцитов: Т-лимфоцитов (CD3+) и активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR+), В-лимфоцитов (CD19+), Т-хелперов/Т-индукторов (CD4+) и супрессоров/цитотоксических (CD8+) Т-лимфоцитов, а также естественных киллеров (NK) (CD16+ или CD56+). Также возможно определение иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺).

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Лимфоциты человека, исходя из их биологической функции и экспрессии поверхностного антигена клеток, которая коррелирует с этой функцией, можно разделить на три основные популяции: 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.

Использувавшиеся ранее методы количественного анализа субпопуляций лимфоцитов были затруднительными вследствие их зависимости от методики, трудоемкости или невысокой специфичности относительно линий дифференцировки клеток. К классическим методам относится определение Т-лимфоцитов путем реакции

* Патенты США № 4 987 086 и 5 064 616.

розеткообразования с эритроцитами барана¹ и определение В-лимфоцитов с помощью эритроцитов барана, нагруженных мечеными флуорохромом поликлональными антителами к поверхностному иммуноглобулину.¹ Методы анализа цитолитических лимфоцитов включают метод локального гемолиза² и анализ цитотоксичности путем регистрации высвобождения радиоактивного хрома.³

Реагенты на основе антител применялись для распознавания поверхностного антигена клеток методами флуоресцентной микроскопии, электронной микроскопии и радиоактивных меток.⁴ Микроскопические методы не являются высокочувствительными вследствие ограниченного количества анализируемых клеток, в то время как методы с использованием радиоактивных изотопов предполагают соблюдение дополнительных нормативных требований относительно безопасности и утилизации отходов. Метод проточной цитометрии, использующий непрямую иммунофлуоресценцию и обеспечивающий чувствительность анализа⁵, требует дополнительного этапа, заключающегося в добавлении меченого флуорохромом вторичного реагента.

Для проведения проточно-цитометрического анализа лимфициты цельной крови человека традиционно обрабатывались методами выделения в градиенте плотности. Результаты исследований показали, что эти методы являются трудоемкими, включают большое количество манипуляций с кровью, и могут приводить к потере субпопуляций лимфоцитов.^{6–8} Метод лизирования цельной крови, применяемый с данным набором, не требует выделения в градиенте плотности и поэтому позволяет сократить время подготовки образца и уменьшить количество манипуляций с цельной кровью (см. раздел 2.2 в Becton Dickinson *Monoclonal Antibodies Source Book* (Библиографический указатель Becton Dickinson по моноклональным антителам)).⁶

Разработка технологии применения моноклональных антител и метода проточной цитометрии сделала возможным использование новых подходов к определению субпопуляций лимфоцитов и иммунному мониторингу. Меченные флуорохромом моноклональные антитела и многоцветная проточная цитометрия обеспечивают возможность одновременного количественного анализа двух и более субпопуляций лейкоцитов. Иммунный мониторинг проводится с помощью проточных цитометров, таких как BD FACScan™, которые точно определяют характеристики клеток, выполняя анализ по четырем параметрам. FACScan при использовании с программным обеспечением Simultest IMK Plus определяет характеристики клеток в количестве до 50 000 в одном образце, выполняя одновременный анализ прямого светорассеяния (FSC), бокового светорассеяния (SSC), и многоцветной флуоресценции.

Клиническое применение*

Общие процентные доли Т- и В-лимфоцитов используются для выявления некоторых форм иммунодефицитных^{9, 10} и некоторых типов аутоиммунных заболеваний.^{11, 12}

Повышение содержания активированных Т-лимфоцитов (HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов) может наблюдаться при состояниях, сопровождающихся активацией иммунной системы¹³, которые могут быть вызваны инфекцией¹⁴ или указывать на угрозу отторжения в случае мониторинга состояния трансплантата.¹⁵ Фактическую причину активации иммунной системы необходимо подтвердить результатами дополнительных клинических и лабораторных анализов.

* Не все исследования, на которые ссылается данный раздел, проводились с применением реагентов BD.

Лимфоциты-хелперы/индукторы являются субпопуляцией Т-лимфоцитов ($CD3^+$), которая также экспрессирует антиген $CD4$. Супрессоры/цитотоксические лимфоциты экспрессируют антиген $CD8$ и в принципе являются субпопуляцией Т-лимфоцитов ($CD3^+$), несмотря на то что НК-лимфоциты также являются $CD8^+$.¹⁶ Определение процентных долей лимфоцитов $CD4^+$ и $CD8^+$ может быть полезно при мониторинге иммунного статуса пациентов с иммунодефицитными или аутоиммунными заболеваниями, а также иммунных реакций. Относительная процентная доля субпопуляции $CD4^+$ снижена, а субпопуляции $CD8^+$ повышена у большинства пациентов с врожденным или приобретенным иммунодефицитом,⁹ таким как тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД)⁹ и синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).¹⁷

Процентная доля супрессоров/цитотоксических клеток может выходить за пределы нормального диапазона при некоторых аутоиммунных заболеваниях¹¹ и определенных иммунных реакциях, таких как острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ)¹⁸ и отторжение трансплантата.¹⁵ Относительная процентная доля популяции лимфоцитов $CD8^+$ часто снижена в активной фазе системной красной волчанки (СКВ), но может быть повышена у пациентов с СКВ при прохождении терапии стероидами.¹

Соотношение $CD4^+/CD8^+$ (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

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

с наличием или подозрением на развитие аутоиммунных заболеваний^{11, 12} или иммунодефицита.^{1, 17} В большинстве случаев иммунодефицитных состояний относительные процентные доли лимфоцитов-хелперов были снижены, а лимфоцитов-супрессоров — повышены. В таких состояниях также может отмечаться Т-клеточная лимфопения.^{10, 19} Кроме того, это соотношение использовалось для мониторинга начала острой РТПХ у пациентов, перенесших трансплантацию костного мозга.¹⁸ Наряду с тем что иммунорегуляторный индекс (соотношение $CD4^+/CD8^+$) является полезным индикатором, его использование имеет ряд специфических ограничений, которые приведены в параграфах 10—13 раздела 9 «Ограничения» данной инструкции-вкладыша.

Было показано, что естественные киллеры (NK-лимфоциты), определяемые как CD3-отрицательные и CD16- или CD56-положительные,²⁰ являются медиаторами цитотоксичности в отношении определенных опухолевых или инфицированных вирусами клеток-мишеней. NK-опосредованная цитотоксичность не требует присутствия в клетке-мишени молекул белков главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I или II.²¹ Снижение активности NK-лимфоцитов наблюдается у пациентов со СПИД, а также в отдельных случаях СПИД-ассоциированного комплекса и синдрома лимфаденопатии.²²

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор содержит шесть реагентов Simultest на основе пар мышиных моноклональных антител, конъюгированных с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE), включая LeucoGATE™ (CD45/CD14) (реагент А) для установки гейта анализа лимфоцитов

и Simultest Control IgG₁ FITC/IgG_{2a} PE (реагент В) для установки маркеров флуоресценции вокруг отрицательной популяции и определения антиген-неспецифического связывания антител. Набор также содержит лизирующий раствор* (реагент G) для подготовки клеток методом лизирования цельной крови. Для оценки данных компания BD рекомендует использовать проточные цитометры FACSscan и программное обеспечение Simultest IMK Plus.

Свежий образец периферической крови получают путем венепункции и окрашивают не позднее чем через 6 часов каждым из шести реагентов на основе антител набора Simultest IMK Plus. При добавлении реагентов на основе моноклональных антител в цельную кровь человека происходит специфическое связывание меченых флуорохромом антител с поверхностными антигенами лейкоцитов. После этого окрашенные образцы обрабатываются лизирующим раствором, который вызывает лизис эритроцитов, и промываются перед анализом в проточном цитометре.

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. Использование двух флуорохромов обеспечивает возможность одновременного анализа сразу двух цветов благодаря тому, что при возбуждении лучом ионного аргонового лазера (488 нм) каждый флуорохром излучает свет на разных длинах волн. Окрашенные FITC лимфоциты излучают желто-зеленый свет (максимум эмиссии при бл. на 515 нм), а окрашенные PE — красно-оранжевый (максимум эмиссии при бл. на 580 нм).

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

Клетки также взаимодействуют с излучением лазера, рассеивая его. Результаты измерения прямого светорассеяния (FSC) света в высокой степени коррелируют с размером клеток, а бокового светорассеяния (SSC) — являются показателем клеточной неоднородности. Проточный цитометр BD FACScan с программным обеспечением Simultest IMK Plus выполняет подсчет клеток в количестве, достаточном для того, чтобы обеспечить пропускание гейтом как минимум 2000 лимфоцитов. Файлы данных необходимо сохранить в режиме списка с заданными логическими именами, для того чтобы программа Simultest IMK Plus могла их использовать для последующего анализа.

Программа Simultest IMK Plus использует LeucoGATE (реагент А) для установки гейта анализа лимфоцитов, который пропускает не менее 98 % нормальных зрелых (небластных) лимфоцитов в образце. Однако если гейт пропускает 3 % и более моноцитов, программа автоматически сужает гейт светорассеяния до уровня пропускания не менее чем 95 % лимфоцитов, содержащихся в образце.

Программа автоматически выявляет и рассчитывает процентные доли примесей моноцитов, гранулоцитов и дебриса, которые пропускает гейт анализа лимфоцитов LeucoGATE, на основе характеристик бокового светорассеяния (SSC), прямого светорассеяния (FSC) и флуоресценции. Подробную информацию о порядке установки программой гейтов и автоматической корректировки процентных долей субпопуляций на основе процента чистоты гейтированной популяции лимфоцитов см. в *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*.

Присутствие бластных клеток может отрицательно влиять на процедуру гейтирования и приводить к сбою процесса обработки. Поэтому образцы, содержащие бластные клетки, могут потребовать

анализа другими методами. Если программа не может установить гейт, распечатка будет содержать соответствующее сообщение. Полный список сообщений об ошибках программного обеспечения см. в *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*.

Программа использует отрицательный контроль (реагент В) для установки маркеров «флуоресценция-1» (FL1) и «флуоресценция-2» (FL2) вокруг отрицательной популяции лимфоцитов и оценки величины антиген-неспецифического связывания антител, которое в основном обусловлено Fc-рецепторами. Если более 5 % контрольных событий выходит за маркеры отрицательного контроля FL1 или FL2, на экране компьютера и в лабораторной распечатке для пробирки контроля В отображается сообщение об ошибке «too much nonspecific staining» (слишком сильное неспецифическое окрашивание). В ходе обработки программой пробирки отрицательного контроля оператору следует проверять сообщения об ошибках, которые указывают на антиген-неспецифическое связывание антител.

Отрицательный контроль представляет собой смесь моноклональных антител, конъюгированных с теми же флуорохромами (FITC и PE), что и реагенты для анализа. Антитела контроля специфичны антигенам, не присутствующим на лейкоцитах человека. Контроль следует использовать для окрашивания отдельной аликвоты каждого образца пациента.

Для каждого образца пациента с помощью LeucoGATE (пробирка А) устанавливается гейт анализа лимфоцитов, а с помощью контроля (пробирка В) определяются маркеры флуоресценции, которые используются для анализа последующих пробирок (с С по F). При выборе функции Quadrant Correction («Коррекция по квадрантам») в главном меню программы IMK Plus субпопуляции лимфоцитов

в пробирках С—F подсчитываются и выражаются в процентных долях лимфоцитов в гейте анализа. Программа Simultest IMK Plus предоставляет отчет с результатами подсчета этих иммунологически значимых субпопуляций лимфоцитов в LWB, представленных в виде процентных долей общего количества циркулирующих (небластных) лимфоцитов человека. Кроме того, отчет включает иммунорегуляторный индекс ($CD4^+/CD8^+$). Если эта функция программы не используется, результаты будут представлены как процентные доли общего количества гейтированных событий.

В целях контроля качества программа автоматически выполняет дифференциальный подсчет трех фракций для определения процентных долей моноцитов, гранулоцитов и лимфоцитов, и печатает его результаты только для сравнения с результатами дифференциального подсчета лейкоцитов стандартным лабораторным методом.²³ Для дифференциального подсчета трех фракций программа использует алгоритм идентификации трех популяций клеток на основе FSC, SSC и флуоресценции. Моноциты являются $CD14$ -положительными и характеризуются сигналом SSC, средним между лимфоцитами и гранулоцитами. Лимфоциты и гранулоциты также можно различить по уровню сигнала SSC. Лимфоциты характеризуются низким сигналом SSC, а гранулоциты — высоким.

ПРИМЕЧАНИЕ. Получаемые Simultest IMK Plus 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 IMK Plus для получения абсолютных значений.

4. РЕАГЕНТЫ

Комплект поставки реагентов в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов

Все реагенты на основе моноклональных антител содержат мышинные иммуноглобулины, конъюгированные с FITC или PE, в 1,0 мл буферного солевого раствора с желатином и 0,1 % азида натрия. Моноклональные антитела получают путем слияния клеток миеломы мышей с клетками селезенки или лимфатического узла мышей линии BALB/c. Соотношение флуоресцеин/белок (F:P) для реагентов BD на основе моноклональных антител находится в диапазоне 2—10. Соотношение F:P для каждого реагента оптимизировано в соответствии с его назначением.

Реагент А — LeucoGATE (CD45/CD14), 1,0 мл.

LeucoGATE предназначен для оценки и установки гейта светорассеяния, который отличает лимфоциты от гранулоцитов, моноцитов, незлизованных или ядродержащих эритроцитов (ККК) и дебриса. Этот реагент содержит меченые FITC антитела к CD45 (клон 2D1)^{24–26} для идентификации лейкоцитов и меченые PE антитела к CD14 (клон МфР9)^{27–29} для идентификации моноцитов.

Антитела к CD45³⁰ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных моноклеарными клетками периферической крови человека. Это антитело состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей IgG₁. Данный антиген присутствует на всех лейкоцитах человека и принимает участие в процессах сигнальной трансдукции,

преобразуя сигналы, поступающие от других поверхностных молекул.³⁰ Молекулярная масса антигена, распознаваемого этим антителом, составляет от 170 до 220 килодальтон (кДа).³⁰

Антитела к CD14²⁷ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей Sp2/0 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных моноцитами периферической крови пациента с ревматоидным артритом. Это антитело состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышинового IgG_{2b}. Молекулярная масса антигена, распознаваемого этим антителом, составляет 53 кДа.³¹ Этот антиген является дифференцировочным антигеном клеток миелоидного ряда³¹ и присутствует на 75—90 % моноцитов человека.³² Антитело к CD14 слабо реагирует с гранулоцитами.³³

Реагент В — Control (контроль), 1,0 мл.

Реагент Control (контроль) предназначен для установки маркеров квадрантов FL1 и FL2 вокруг неокрашенной (отрицательной) популяции лимфоцитов с целью определения границ между отрицательными и положительными популяциями клеток, а также оценки антиген-неспецифического связывания антител, которое в основном обусловлено Fc-рецепторами. Он содержит меченые FITC антитела изотипа IgG₁ (клон X40) и меченые PE антитела изотипа IgG_{2a} (клон X39) — мышинные моноклональные антитела, которые избирательно реагируют с гемоцианином фиссуреллы (KLH), антигеном, который не присутствует на лейкоцитах человека.

Реагент С — CD3/CD19, 1,0 мл.

Реагент CD3/CD19 предназначен для подсчета Т- и В-лимфоцитов. Он содержит меченые FITC антитела к CD3 (клон SK7)^{34—37} для идентификации Т-лимфоцитов и меченые PE антитела к CD19 (клон 4G7)³⁸ для идентификации В-лимфоцитов.

Антитела к CD3³⁶ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных тимоцитами человека. Это антитело состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышинового IgG₁. Антитело к CD3 реагирует с эпсилон-цепью комплекса рецептора антигена CD3/Т-клеточного антигена (ТкР). Этот комплекс состоит из не менее чем четырех белков с молекулярной массой от 20 до 30 кДа.³⁹ Антиген, распознаваемый антителами к CD3, нековалентно связан с α/β или γ/δ субъединицами ТкР (70—90 кДа).⁴⁰

Антитела к CD19³⁸ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных клетками хронического лимфолейкоза человека. Это антитело состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей IgG₁. Этот антиген присутствует на В-лимфоцитах человека на всех этапах их созревания, но отсутствует на плазматических клетках. Антиген CD19 может быть вовлечен в процессы активации и пролиферации В-лимфоцитов.⁴¹ Молекулярная масса антигена, распознаваемого этим антителом, составляет 90 кДа.⁴¹

Реагент D — CD4/CD8, 1,0 мл.

Реагент CD4/CD8 предназначен для одновременного распознавания хелперов/индукторов и супрессоров/цитотоксических лимфоцитов. Он содержит меченые FITC антитела к CD4 (клон SK3)^{42, 43} для идентификации хелперов/индукторов и меченые PE антитела к CD8 (клон SK1)^{42, 43} для идентификации супрессоров/цитотоксических лимфоцитов.

Антитела к CD4⁴² получают путем гибридизации клеток миеломы мышей NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных Т-лимфоцитами периферической крови человека.

Они состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышинового IgG₁. Антитело к CD4 распознает антиген CD4, который взаимодействует с молекулами белков ГКГС класса II и является основным рецептором для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).^{44, 45} Молекулярная масса этого антигена составляет 59 кДа. Цитоплазматический участок антигена связан с протеин-тирозинкиназой p56^{lck}. Антиген CD4 может регулировать функцию антигена CD3/комплекса ТкР.⁴⁶ Антитело к CD4 реагирует с моноцитами/макрофагами и Т-лимфоцитами-хелперами/индукторами.⁴⁷

Антитела к CD8⁴² получают путем гибридизации клеток миеломы мышей NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных Т-лимфоцитами периферической крови человека. Они состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышинового IgG₁. Антиген CD8 присутствует на субпопуляции супрессоров/цитотоксических Т-лимфоцитов человека,^{35, 43} а также субпопуляции NK-лимфоцитов.¹⁶ Антигенные детерминанты CD8 взаимодействуют с молекулами белков ГКГС класса I, повышая степень адгезии между CD8⁺ Т-лимфоцитами и клетками-мишенями.^{48—50} Связывание антигена CD8 с белками ГКГС класса I усиливает активацию покоящихся Т-лимфоцитов.^{48—51} Антиген CD8 экспрессируется на α-субъединице (32 кДа) связанного дисульфидным мостиком бимолекулярного комплекса.^{52, 53} Антиген CD8 спарен с p56^{lck}. Комплекс CD8:p56^{lck} может принимать участие в процессах активации Т-лимфоцитов путем опосредования взаимодействий между антигеном CD8 и антигеном CD3/комплексом ТкР.^{50, 51}

Реагент Е — CD3/Anti-HLA-DR, 1,0 мл.

Реагент CD3/Anti-HLA-DR предназначен для подсчета Т-лимфоцитов, DR⁺ не-Т-лимфоцитов (в основном В-лимфоцитов) и

активированных Т-лимфоцитов. Он содержит меченые FITC антитела к CD3 (клон SK7)^{34—37} для идентификации Т-лимфоцитов и меченые PE антитела Anti-HLA-DR (клон L243)⁵⁴ для идентификации DR⁺ не-Т-лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов.

Антитела Anti-HLA-DR получают путем гибридизации клеток миеломы мышей NS1/1-AG4 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных клетками В-лимфобластомы человека линии RPMI 8866. Они состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиноного IgG_{2a}. Антиген HLA-DR (лейкоцитарный антиген человека, D-связанный) представляет собой молекулу белка ГКГС класса II. Этот антиген является трансмембранным гликопротеином, состоящим из α - и β -субъединиц с молекулярной массой 36 и 27 кДа соответственно.^{54—55} Это антитело реагирует с неполиморфным эпитопом HLA-DR.^{54—56} Антиген экспрессируется на В лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, активированных Т-лимфоцитах, активированных NK-лимфоцитах и человеческих клетках-предшественниках.^{14, 19, 57—60}

Реагент F — CD3/CD16 + CD56*, 1,0 мл.

Реагент CD3/CD16 + CD56 предназначен для идентификации Т- и NK-лимфоцитов. Он содержит меченые FITC антитела к CD3 (клон SK7)^{34—37} для идентификации Т-лимфоцитов. Также он содержит меченые PE антитела к CD16 (клон B73.1)^{61—64} и CD56 (клон MY31)^{63, 65} для идентификации субпопуляций NK- и Т-лимфоцитов.

Антитела к CD16⁶⁴ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей P3X-63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных NK-лимфоцитами. Это антитело состоит из

* Патент США № 4 895 796.

тяжелых цепей и легких каппа-цепей IgG₁.^{61—63} Антиген, распознаваемый антителами к CD16, представляет собой белок с молекулярной массой 50—65 кДа, который является рецептором IgG Fc III и присутствует на NK-лимфоцитах и нейтрофилах.²⁰

Антитела к CD56⁶⁵ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей Sp2/0 с клетками мышей линии (B6хBALB/c)F₁, иммунизированных клетками линии KG1a. Это антитело состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей IgG₁. Молекулярная масса гликозилированного антигена, распознаваемого этим антителом, находится в диапазоне 175—220 кДа^{20, 66} (и составляет 137 кДа в дегликозилированном состоянии⁶⁷); он присутствует на NK-лимфоцитах. Антиген CD56 вовлечен в процессы гомотипической адгезии нервных клеток и клеточной дифференцировки в ходе эмбриогенеза.⁶⁵

Реагент G — 10-кратный лизирующий раствор, 60 мл.

Реагент G представляет собой 10-кратный концентрат буферного лизирующего раствора, содержащий до 50 % диэтиленгликоля и до 15 % формальдегида. См. параграфы 9—11 пункта «Меры предосторожности» ниже. Хранение при температуре 2—25 °C обеспечивает стабильность 10-кратного концентрата до даты истечения срока годности, которая указана на этикетке. Для использования необходимо развести концентрат в пропорции 1:10 водой класса ЧДА комнатной температуры (20—25 °C). Хранить в стеклянной таре при комнатной температуре. Приготовленный раствор стабилен в течение 1 месяца при комнатной температуре.

Меры предосторожности

1. Для диагностики *in vitro*.
2. Хранение при температуре 2—8 °С обеспечивает стабильность реагентов на основе антител до даты истечения срока годности, которая указана на этикетке. Не использовать после истечения срока годности.
3. Реагенты на основе антител нельзя замораживать или подвергать прямому воздействию света при хранении или инкубации с клетками.
4. Настройки времени или температуры инкубации или центрифугирования, отличные от указанных, могут приводить к возникновению ошибок.
5. Для получения оптимальных результатов необходимо выполнять окрашивание образцов крови не позднее чем через 6 часов после венепункции.
6. Изменение внешнего вида реагентов, например, выпадение осадка или обесцвечивание, свидетельствует о нестабильности или деградации. В таких случаях не следует использовать реагенты.
7. Реагенты на основе антител содержат в качестве консерванта азид натрия, однако следует принимать меры во избежание микробного загрязнения, которое может приводить к получению неверных результатов.

-
8. **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 образование взрывоопасных условий.
9. **ОСТОРОЖНО!** Реагент G содержит до 50 % диэтиленгликоля и до 15 % формальдегида. См. инструкции по подготовке и хранению реагента G, приведенные выше.
10. **ОСТОРОЖНО!** Набор BD Simultest IMK Plus содержит диэтиленгликоль и формальдегид. Формальдегид вреден при вдыхании, при контакте с кожей и при попадании внутрь (R20/21/22). Он обладает раздражающим действием на глаза и кожу (R36/38). Продолжительное воздействие может вызывать рак. Возможный риск необратимых эффектов (R68). Может вызывать сенсибилизацию при контакте с кожей (R43). Хранить под замком в недоступном для детей месте (S1/2). Использовать подходящую защитную одежду и перчатки (S36/37). Диэтиленгликоль даже в малых количествах может быть смертельно опасным. При попадании внутрь немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите данную упаковку или этикетку (S46). Утилизировать согласно федеральным, государственным и местным нормативам.

-
11. **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

Набор Simultest IMK Plus предназначен для использования с проточным цитометром производства компании BD, 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.

Рекомендуется использовать следующие системы.

- Проточный цитометр BD FACScan, оснащенный компонентами, необходимыми для детектирования трехцветной флуоресценции и светорассеяния по двум параметрам (BD кат. № 34001010). Подробная информация по использованию прибора приведена в *Руководстве оператора FACScan*.
- Компьютерная система BD CONSORT™ 30 или CONSORT 32 и внешние устройства (входит в состав системы FACScan). Подробная информация по использованию приведена в *Руководстве пользователя программного обеспечения CONSORT 30* или *Руководстве оператора системы CONSORT 32*.

-
- Программное обеспечение BD Simultest IMK Plus (BD кат. № 01-20966-01, редакция А, или 34001860). Подробная информация по использованию приведена в *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*.
 - Калибровочные частицы CaliBRITe™ Beads (BD кат. № 349502). Эти частицы могут использоваться для настройки напряжения фотоумножителей и компенсации флуоресценции, а также проверки чувствительности проточного цитометра FACScan. Подробная информация по использованию приведена в инструкции-вкладыше упаковки *CaliBRITe Beads*.
 - Программное обеспечение AutoCOMP™ (BD кат. № 34001390). Подробная информация по использованию приведена в *Руководстве пользователя программного обеспечения AutoCOMP*.

Все рабочие характеристики были получены при использовании вышеуказанных систем. Другие системы могут иметь другие характеристики.

Для получения информации относительно использования данных реагентов в исследовательских целях с применением других приборов FACS обратитесь в центр поддержки клиентов компании BD.

6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Отберите кровь путем венопункции^{5, 68} с соблюдением правил асептики в стерильную вакуумную пробирку VACUTAINER® с EDTA-K₃ (фиолетовая крышка). Для данной процедуры необходимо не менее 1 мл цельной крови. Для получения оптимальных результатов необходимо выполнять окрашивание образцов крови не позднее, чем через 6 часов после забора. **Кровь с антикоагулянтom можно хранить перед окрашиванием не дольше 6 часов при комнатной температуре (20—25 °C).** Охлаждение образцов крови перед окрашиванием может приводить к получению искаженных результатов.

Перед окрашиванием необходимо получить результаты подсчета лейкоцитов (БКК) и дифференциального подсчета БКК для того же образца цельной крови. Диапазон приемлемых концентраций БКК составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ БКК/мкл. Если результат подсчета превышает $9,8 \times 10^3$ БКК/мкл, необходимо разбавить образец фосфатно-солевым буфером 1X, содержащим 0,1 % азида натрия (см. параграф 3 раздела 9 «Ограничения»). Для анализа образцов с результатом подсчета ниже $3,5 \times 10^3$ БКК/мкл может потребоваться большее количество крови, а также выполнение процедуры разделения для повышения концентрации клеток.

Мешающие факторы

Не следует использовать ранее зафиксированные и хранившиеся клетки. 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, взятые у пациентов, получающих иммунодепрессанты, могут давать плохое разрешение. Присутствие аномальных (бластных) клеток, а также ядросодержащих или нелизированных эритроцитов может отрицательно влиять на результаты анализа. Не следует принимать пробирки с гемолизированными образцами или образцами цельной крови объемом менее 1 мл.

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

7. ПРОЦЕДУРА

Поставляемые реагенты

См. пункты «Комплект поставки реагентов в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов» и «Меры предосторожности» раздела 4 «Реагенты».

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки

1. Пробирки для сбора крови VACUTAINER с EDTA-K₃ или эквивалентные.
2. Одноразовые полистироловые пробирки 12 x 75 мм Falcon™ (BD кат. № 352058) или эквивалентные.
3. Мешалка «вортекс».

4. Низкоскоростная центрифуга (200 x g) с горизонтальным ротором и вставками для пробирок 12 x 75 мм.
5. Вакуумный аспиратор с ловушкой.
6. Микропипеточный дозатор с наконечниками (Pipetman™ или эквивалентный).
7. Фосфатно-солевой буфер (PBS), 1X (модифицированный раствор Дюльбекко, pH $7,2 \pm 0,2$; 0,01 моль/л PO_4 ; 0,15 моль/л NaCl).⁵ Этот реагент не содержит кальция, магния, фенолового красного или азиды натрия. Перед использованием PBS необходимо отфильтровать через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Хранить при температуре 2—8 °C.
8. PBS, в соответствии с параграфом 7 выше, с 0,1 % азиды натрия.
9. Проточная жидкость.
10. Параформальдегид (1 %) для фиксации клеток. Растворите 1 г параформальдегида в 100 мл PBS с 0,1 % азиды натрия, 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 2—8 °C.
11. Вода «чистая для анализа» (система очистки milli-Q или эквивалентная).

Окрашивание и фиксация клеток

Образцы цельной крови окрашиваются реагентами А—F. После окрашивания выполняется лизирование ККК с помощью разведенного реагента G (лизирующего раствора 1X). Если БКК достаточно, разделять клетки перед окрашиванием не требуется. См. раздел 6 «Забор и подготовка образца» и параграф 3 в разделе 9 «Ограничения». Пробирки должны быть защищены от прямого воздействия света. Выполнять процедуру следует при комнатной температуре (20—25 °C), используя реагенты с такой же температурой. См. пункт «Меры предосторожности» раздела 4 «Реагенты».

1. Промаркируйте по шесть пробирок 12 x 75 мм для каждого образца пациента (от А до F). На каждой пробирке также укажите идентификационный номер образца.
2. Внесите в пробирку А 20 мкл реагента А, в пробирку В — 20 мкл реагента В, в пробирку С — 20 мкл реагента С, в пробирку D — 20 мкл реагента D, в пробирку Е — 20 мкл реагента Е, в пробирку F — 20 мкл реагента F.
3. Используя для каждого образца пациента новый наконечник микропипеточного дозатора, аккуратно добавьте на дно каждой из шести промаркированных пробирок по 100 мкл хорошо перемешанного образца цельной крови соответствующей концентрации с антикоагулянтом. Необходимая концентрация БКК составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ БКК/мкл. Тщательно перемешайте содержимое пробирок, встряхивая их в течение 3 секунд на вортексе с низкой скоростью, и инкубируйте 15—30 минут при комнатной температуре (20—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 остается на стенке пробирки, она может быть не окрашена реагентом.

4. Разбавьте лизирующий раствор 10X до концентрации 1X, следуя инструкциям для реагента G, которые приведены в пункте «Комплект поставки реагентов в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов» раздела 4 «Реагенты». Добавьте в каждую пробирку по 2 мл лизирующего раствора 1X комнатной температуры (20—25 °C). Сразу же хорошо перемешайте содержимое пробирок, встряхивая их в течение 3 секунд на вортексе с низкой скоростью, и инкубируйте 10—12 минут в темноте при комнатной температуре (20—25 °C). Не инкубируйте дольше 12 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ. Не допускайте излишне продолжительного воздействия лизирующих реагентов на клетки, так как это может привести к разрушению лейкоцитов. См. параграф 17 раздела 9 «Ограничения».

5. Сразу после инкубации центрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 300 x g и комнатной температуре (20—25 °C).
6. Удалите супернатант, оставив в каждой пробирке приблизительно 50 мкл жидкости, чтобы не повредить осадок.

-
7. Тщательно перемешайте, встряхивая на вортексе с низкой скоростью, чтобы вновь суспендировать клеточный осадок в остаточной жидкости, после чего добавьте в каждую пробирку по 2 мл PBS с 0,1 % азида натрия. Тщательно перемешайте, встряхивая в течение 3 секунд на вортексе с низкой скоростью. Центрифугируйте в течение 5 минут при $200 \times g$ и комнатной температуре (20—25 °C).
 8. Аспирируйте супернатант, оставив в каждой пробирке приблизительно 50 мкл жидкости, чтобы не повредить осадок.
 9. Тщательно перемешайте, встряхивая 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, встряхивая в течение 3 секунд на вортексе с низкой скоростью. Удостоверьтесь в том, что клетки хорошо 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 2—8 °C до анализа в проточном цитометре. Анализ фиксированных клеток необходимо выполнить не позднее чем через 24 часа после окрашивания. Прежде чем вводить клетки в проточный цитометр, тщательно перемешайте их на вортексе (с низкой скоростью), чтобы уменьшить агрегацию.

Проточная цитометрия

Следуйте инструкциям компании BD по проведению анализа методом двухцветной проточной цитометрии, а также указаниям раздела 5 «Прибор». Рекомендуется придерживаться следующей общей методики. Вначале проточный цитометр FACScan подготавливается к проведению анализа образца с помощью калибровочных частиц CaliBRITE и программы AutoCOMP. Затем в проточном цитометре анализируются пробирки с окрашенным образцом и результаты обрабатываются программой Simultest IMK Plus. Подробные инструкции см. в *Руководстве оператора FACScan*, инструкции-вкладыше упаковки *CaliBRITE Beads*, *Руководстве пользователя программного обеспечения AutoCOMP* и *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*. Компания BD рекомендует сохранять файлы данных пациентов для последующего анализа.

Установите и настройте компенсацию для проточного цитометра BD FACScan. С помощью CaliBRITE Beads и программы AutoCOMP установите напряжения фотоумножителей (ФЭУ), настройте компенсацию флуоресценции и проверьте чувствительность датчика. Более подробную информацию см. в инструкции-вкладыше упаковки *CaliBRITE Beads*, *Руководстве пользователя программного обеспечения AutoCOMP* и *Руководстве оператора FACScan*.

Выполните анализ всех пробирок с образцом в проточном цитометре и получите с помощью программы Simultest IMK Plus файлы данных в режиме списка. Подробные инструкции по использованию программы приведены в *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*. Программа автоматически подсчитает достаточное количество событий, чтобы получить в пределах гейта не менее 2000 лимфоцитов. Программа

подсчитывает количество событий в каждом квадранте и затем рассчитывает процентную долю событий положительных лимфоцитов в квадрантах Q1 (слабая желто-зеленая/яркая красно-оранжевая флуоресценция), Q2 (яркая желто-зеленая/яркая красно-оранжевая или двойная флуоресценция), Q3 (слабая желто-зеленая/слабая красно-оранжевая флуоресценция) и Q4 (яркая желто-зеленая/слабая красно-оранжевая флуоресценция) (см. рис. 1).

Q1 Слабая желто-зеленая/яркая красно-оранжевая	Q2 Яркая желто-зеленая/яркая красно-оранжевая (двойная флуоресценция)
Q3 Слабая желто-зеленая/слабая красно-оранжевая	Q4 Яркая желто-зеленая/слабая красно-оранжевая

Рис. 1. Квадранты отображения флуоресценции и соответствующие цвета обозначены как Q1—Q4

Пробирка А с LeucoGATE используется для гейтирования лимфоцитов. BD FACScan с помощью программы Simultest IMK Plus автоматически устанавливает гейт анализа лимфоцитов таким образом, чтобы максимально устранить дебрис, моноциты и гранулоциты (см. рис. 2 и 3). Подробная информация о порядке установки гейта приведена в *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*. При недостаточном разделении популяций образец отмечается флагом, предупреждающим оператора, и отображается соответствующее сообщение. Ошибки гейтирования могут быть следствием неправильной подготовки образца или настройки прибора.

Контрольная пробирка В используется для установки маркеров интенсивности флуоресценции. Программа Simultest IMK Plus автоматически использует гейт анализа лимфоцитов, заданный с помощью LeucoGATE, и затем устанавливает маркеры FL1 и FL2. Эти маркеры определяют границы между событиями положительного и отрицательного окрашивания в рамках гейта лимфоцитов. Маркеры флуоресценции должны быть установлены вокруг отрицательной популяции, которая отображается как кластер событий со слабой флуоресценцией и желто-зеленого, и красно-оранжевого цвета.

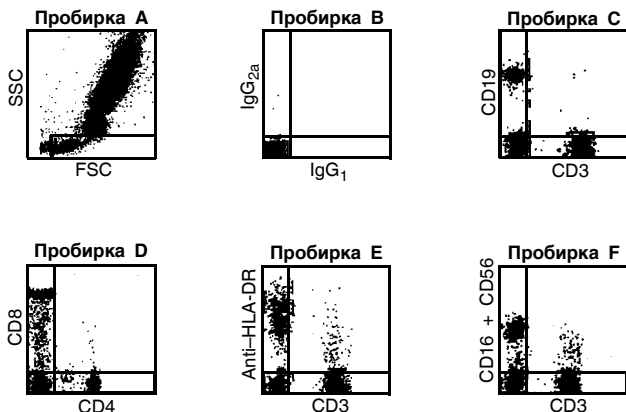


Рис. 2. Результат анализа образцов лизированной цельной крови пациента мужского пола с нормальными гематологическими характеристиками, окрашенных реагентами Simultest IMK Plus, в проточном цитометре FACScan. LeucoGATE, который использовался для уменьшения влияния дебриса, моноцитов и гранулоцитов в гейте, показанном для пробирки А. Точечные графики FL1 (ось x) относительно FL2 (ось y) представлены для пробирок В—F

Если после установки маркеров более 5 % результатов подсчета для пробирки В остается в квадрантах Q1 (слабая желто-зеленая/яркая красно-оранжевая), Q2 (яркая желто-зеленая/яркая красно-оранжевая) и Q4 (яркая желто-зеленая/слабая красно-оранжевая), то возможно имело место антиген-неспецифическое связывание антител. Программа отобразит предупреждающее сообщение «too much nonspecific staining» (слишком сильное неспецифическое окрашивание). Если отображается такое сообщение об ошибке, необходимо взять из исходной аликвоты цельной крови с антикоагулянтом новый образец и полностью повторить процедуру окрашивания.

Данные для пробирок С, D, E и F получены и проанализированы в программе Simultest IMK Plus при использовании гейтов и маркеров, установленных с помощью пробирок А и В. Эти результаты необходимо анализировать в соответствии с критериями, приведенными в пункте «Контроль качества», и инструкциями раздела 8 «Результаты».

Контроль качества

Для получения оптимальных результатов компания BD рекомендует перед использованием реагентов Simultest IMK Plus для выполнения анализа в проточном цитометре FACScan установить напряжения фотоумножителей, настроить компенсацию флуоресценции и проверить чувствительность прибора с помощью CaliBRITE Beads и программы AutoCOMP. Информация относительно оптимизации параметров проточного цитометра перед анализом образцов пациентов приведена в приложении А *Руководства пользователя Simultest IMK*.

Пробирка С (CD3/CD19)

Q1 CD3 ⁺ CD19 ⁺ В-лимфоциты	Q2 Антиген-неспецифическое связывание антител
Q3 Неокрашенные лимфоциты; контаминирующие моноциты, гранулоциты и дебрис	Q4 CD3 ⁺ CD19 ⁻ Т-лимфоциты

Пробирка D (CD4/CD8)

Q1 CD4 ⁺ CD8 ⁺ супрессоры/ цитотоксические и NK-лимфоциты	Q2 CD4 ⁺ CD8 ⁺ лимфоциты
Q3 Неокрашенные лимфоциты; гранулоциты и дебрис	Q4 CD4 ⁺ CD8 ⁻ хелперы/ индукторы; моноциты

* См. параграф 15 раздела 9 «Ограничения».

Пробирка E (CD3/Anti-HLA-DR)

Q1 CD3-Anti-HLA-DR ⁺ В-лимфоциты, активированные NK-лимфоциты; моноциты/ макрофаги	Q2 CD3 ⁺ Anti-HLA-DR ⁺ активированные Т-лимфоциты
Q3 Неокрашенные лимфоциты; контаминирующие моноциты, гранулоциты и дебрис	Q4 CD3 ⁺ Anti-HLA-DR ⁻ Т-лимфоциты

Пробирка F (CD3/CD16 + CD56)

Q1 CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ и NK-лимфоциты	Q2 CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ субпопуляция Т-лимфоцитов
Q3 Неокрашенные лимфоциты; контаминирующие моноциты, гранулоциты и дебрис	Q4 CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁻ Т-лимфоциты

Рис. 3. Популяции мононуклеарных клеток в квадрантах Q1—Q4 для пробирок С—F. Популяции отображают первичную реактивность реагентов. (Полный список характеристик реактивности приведен в описаниях реагентов в пункте «Комплект поставки реагентов в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов» раздела 4 «Реагенты»)

Отрицательный контроль, который входит в набор реагентов Simultest IMK Plus, анализируется с каждым образцом пациента с целью установки маркеров FL1 и 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. Изучите изображение на экране компьютера и лабораторный отчет для контрольной пробирки В. Если более 5 % событий для контрольной пробирки выходит за пределы 3-го квадранта, для пробирки В, отобразится сообщение «too much nonspecific staining» (слишком сильное неспецифическое окрашивание). В этом случае результаты для пробирок С—F следует считать сомнительными. См. раздел 12 «Поиск и устранение неисправностей» в конце данной инструкции-вкладыша. Для того чтобы удостовериться в правильности установки маркеров флуоресценции и минимальном уровне антиген-неспецифического окрашивания, необходимо визуально изучить точечные графики для пробирок С—F.

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. 2.

Если при визуальном изучении точечного графика или контуров наблюдается плохое разделение отрицательных и положительных кластеров, можно предположить влияние антиген-неспецифического связывания антител; результаты такого анализа следует отклонить.

Антиген-неспецифическое связывание антител может быть следствием плохого состояния клеток. При выявлении антиген-неспецифического связывания антител см. раздел 12 «Поиск и устранение неисправностей».

Программа Simultest IMK Plus автоматически проанализирует данные и отобразит соответствующее количество предупреждающих сообщений об ошибках. Список возможных сообщений приведен в приложении D *Руководства пользователя Simultest IMK Plus*. С целью оценки качества полученных данных программа будет использовать следующие критерии при анализе точечных графиков для каждого образца.

1. Оператор должен отклонить любые результаты, если для анализа нормального контроля отображается какое-либо из 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 20%)» (чрезмерная контаминация эритроцитами/ядросодержащими эритроцитами и дебрисом, более 20 %); «excessive monocyte (greater than 4%)» или «granulocyte (greater than 4%) contamination of the lymphocyte gate» (чрезмерная контаминация гейта лимфоцитов моноцитами (более 4 %) или контаминация гейта лимфоцитов гранулоцитами (более 4 %)).
2. В случае отсутствия каких-либо явных причин неудачи анализа нормального контроля следует еще раз 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 реагентом G (лизирующим раствором). 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 20 %, программа отметит образец флагом «too many nonlymphs in gate» (чрезмерное количество нелимфоцитарных элементов в гейте) и результаты этого анализа будут необходимо отклонить.
4. Оператор должен удостовериться в том, что результат дифференциального подсчета лимфоцитов в программе Simultest IMK Plus находится в пределах $\pm 10\%$ от результата независимого дифференциального подсчета лейкоцитов. Выход результата подсчета Simultest IMK Plus за пределы указанного диапазона свидетельствует о несоответствии результатов; такой анализ следует считать сомнительным. Или результат подсчета Simultest IMK Plus, или результат независимого лабораторного дифференциального подсчета лейкоцитов является неверным. См. параграф 6 в разделе 9 «Ограничения».
5. Оператор должен удостовериться в согласованности процентных долей Т-лимфоцитов в пробирках C, E и F, содержащих CD3⁺. Если значения общего содержания Т-лимфоцитов в любых двух из этих трех пробирок различаются более чем на 8 %, анализ следует отклонить.

-
6. Хелперы/индукторы и супрессоры/цитотоксические лимфоциты не увеличивают значение общего количества Т-лимфоцитов, так как антиген CD8 также экспрессируется на NK-лимфоцитах. Внутреннюю согласованность анализа можно подтвердить, если при выборе функции Quadrant Correction («Коррекция по квадрантам») в главном меню программы Simultest IMK Plus сумма процентных долей Т-, В- и NK-лимфоцитов составляет $100 \pm 5 \%$. Инструкции по использованию данной функции приведены в *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*.

Также см. раздел 12 «Поиск и устранение неисправностей» в конце данной инструкции-вкладыша.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Расчет корректированных количеств

При активированной функции Quadrant Correction система BD FACScan с помощью программы Simultest IMK Plus автоматически рассчитывает процентную долю каждой указанной субпопуляции в общем количестве лейкоцитов в рамках гейта анализа. Вначале программа вычтет нелимфоцитарные клетки из квадранта 3 (Q3), а затем представит результат в виде процентного содержания лимфоцитов в рамках установленного гейта анализа, используя данные пробирки LeucoGATE (A).

Если удовлетворены все критерии контроля качества, перечисленные в пункте «Контроль качества» раздела 7 «Процедура», функция Quadrant Correction обеспечивает правильный расчет истинных значений для субпопуляций. Однако если критерии контроля качества

не удовлетворены (например, вследствие чрезмерной контаминации гейта нелимфоцитарными элементами), результаты могут быть сомнительными. В таком случае необходимо проанализировать данные вручную, чтобы определить степень влияния перекрестной реактивности нелимфоцитарных элементов на результаты. Если функция Quadrant Correction неактивна, результаты будут представлены как процентные доли в общем гейтированном количестве событий. См. *Руководство пользователя Simultest IMK Plus*.

Используется нижеследующий принцип расчета (значения Q соответствуют количеству результатов в квадрантах).

Из уравнения 1 рассчитывается процентная доля событий для лимфоцитов в рамках гейта анализа LeucoGATE. Это значение указано как «%L» для пробирки A в таблице 1; оно отражает степень чистоты лимфоцитов в рамках гейта, установленного с помощью пробирки LeucoGATE (A).

Таблица 1. Обзор данных, которые представлены на рис. 2, и квадранты, используемые для подсчета субпопуляций

Пробирка	%L*	%M*	%G*	%D*	% общего гейтированного количества лимфоцитов†
A (LeucoGATE)	95	1	3	1	99

Пробирка	Тип клеток	Квадрант	FACScan, % лимфоцитов (корректированный)	Иммунорегуляторный индекс‡
C (CD3/CD19)	Общее количество Т-лимфоцитов	Q4	82	
	Общее количество В-лимфоцитов	Q1	9	
D (CD4/CD8)	Хелперы/индукторы; моноциты	Q2, Q4	50	1,2
	Супрессоры/цитотоксические и NK-лимфоциты	Q1, Q2	41	
E (CD3/Anti-HLA-DR)	Общее количество Т-лимфоцитов	Q4	81	
	Активированные Т-лимфоциты	Q2	18	
F (CD3/CD16+CD56)	Общее количество Т-лимфоцитов	Q4	81	
	NK-лимфоциты	Q1	7	

* %L, %M, %G, и %D — это количества лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и дебриса в рамках гейта, установленного с помощью LeucoGATE, выраженные как процентные доли всех событий в этом гейте. Эти значения отражают качество и степень чистоты гейта.

† Процент общего гейтированного количества лимфоцитов — это количество лимфоцитов в рамках гейта, установленного с помощью LeucoGATE, выраженное как процентная доля в общем количестве лимфоцитов в негейтированном образце. Это значение соответствует доле всех лимфоцитов, пропускаемой гейтом.

‡ Иммунорегуляторный индекс = $\frac{\% \text{ CD4} + \text{лимфоциты}}{\% \text{ CD8} + \text{лимфоциты}}$

N = общее количество событий в рамках гейта лимфоцитов, заданного

LeucoGATE = L + M + G + D, где:

L — количество лимфоцитов в гейте;

M — количество моноцитов в гейте;

G — количество гранулоцитов в гейте;

D — количество дэбриса в гейте.

Уравнение 1. Процент гейтированных лимфоцитов (%L) = $L/N \times 100$.

Уравнение 2а. Процент гейтированных лимфоцитов (корректированный) в Q1, Q2 или Q4 =

$$\frac{\text{Количество гейтированных событий в Q1, Q2 или Q4}}{N \times (\%L/100)} \times 100$$

В уравнении 2а процентные доли положительных клеток в каждом из трех положительных квадрантов (Q1, Q2 и Q4) выражаются как корректированные процентные доли лимфоцитов при условии того, что все нелимфоцитарные элементы в гейте, заданном LeucoGATE, не окрашены. Для расчета поправочного коэффициента в этих квадрантах программа применяет уравнение 2а для Q1, Q2 и Q4.

ПРИМЕЧАНИЕ. Функция Quadrant Correction не корректирует нелимфоцитарные события, которые могут присутствовать в Q1, Q2 и Q4. Поэтому события CD4-положительных моноцитов в Q4 не корректируется программой.

В лабораторном отчете значения для неокрашенных клеток (Q3) представлены в «Согг %L» как процент лимфоцитов, корректированный в Q3. Q3 отображает неокрашенные клетки и, предположительно, все нелимфоцитарные события в рамках гейта,

а также неокрашенные лимфоциты. Таким образом, в дополнение к преобразованию результатов из процентной доли в общем количестве событий в процентную долю лимфоцитов в рамках гейта, в уравнении 2b также из Q3-гейтированных событий вычитаются гейтированные нелимфоцитарные события.

Уравнение 2b. Процент гейтированных неокрашенных лимфоцитов (корректированный) в Q3 (Corr %L) =

$$\frac{\text{Количество гейтированных событий в Q3} - \text{количество гейтированных нелимфоцитарных элементов} \times 100}{N \times (\%L/100)}$$

где:

Количество гейтированных нелимфоцитарных элементов = количество гейтированных событий дэбриса + количество гейтированных гранулоцитов + количество гейтированных моноцитов. См. таблицу 1, пробирка А.

Расчет абсолютных количеств

Абсолютное количество клеток можно рассчитать, если из результатов дифференциального подсчета лейкоцитов с помощью стандартного лабораторного метода получены значения лейкоцитов и процентной доли лимфоцитов. BD FACScan с помощью программы Simultest IMK Plus автоматически рассчитывает абсолютные количества для каждого параметра Simultest IMK Plus, если оператор вводит значения лейкоцитов и процентной доли лимфоцитов, полученные при дифференциальном подсчете лейкоцитов для каждого образца цельной крови пациента. См. *Руководство пользователя Simultest IMK Plus*. Используется нижеследующий принцип расчета.

1. Введите значение лейкоцитов/мкл, полученное для того же образца крови.
2. Введите значение процентной доли лимфоцитов, полученное при лабораторном дифференциальном подсчете лейкоцитов для того же образца. Не используйте результаты дифференциального подсчета трех фракций, полученные в программе Simultest IMK Plus.
3. Подсчет абсолютных количеств для каждой популяции будет выполнен следующим образом:

Абсолютное количество CD4⁺ клеток/мкл =

$$\frac{\%CD4^{+}}{100} \times \frac{\%L}{100} \times (\text{лейкоцитов/мкл})$$

Если данные выражены как абсолютное количество, воспроизводимость и диапазон нормальных значений абсолютного количества будут являться функцией (а) лабораторного диапазона нормальных значений и воспроизводимости результатов подсчета лейкоцитов, (б) результатов расчета процентной доли лимфоцитов, а также (в) диапазона нормальных значений и воспроизводимости результатов расчета процентной доли положительных лимфоцитов для заданного маркера.

Дифференциальный подсчет трех фракций

В лизированной цельной крови с помощью пробирки А (LeucoGATE) можно определять моноциты, лимфоциты и гранулоциты как процентную долю в общем количестве лейкоцитов (см. таблицу 2). BD FACScan с помощью программы Simultest IMK Plus автоматически выполняет дифференциальный подсчет трех фракций (таблица 2). Примеры распечатки данных приведены в *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*.

**Таблица 2. Дифференциальный подсчет трех фракций
на основе данных, представленных на рис. 2**

Дифференциальный подсчет трех фракций*	Процент лейкоцитов
Лимфоциты	25
Моноциты	5
Гранулоциты	70

* Результат дифференциального подсчета трех фракций получают путем выражения количеств лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов во всем негейтированном образце в виде процентных долей в сумме лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов для всего образца.

ПРИМЕЧАНИЕ. Получаемые программой Simultest IMK Plus 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 Simultest IMK Plus для получения абсолютных количеств.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Используйте свежесобранную кровь; выполняйте окрашивание не позднее, чем через 6 часов после венепункции. До окрашивания кровь необходимо хранить при комнатной температуре (20—25 °C), так как клетки, охлажденные перед окрашиванием, могут давать искаженные результаты. Не рекомендуется использовать предварительно фиксированные клетки.
2. Окрашенные и фиксированные клетки необходимо проанализировать не позднее, чем через 24 часа после окрашивания.

3. Для получения правильных результатов образцы цельной крови с содержанием лейкоцитов до $3,5 \times 10^3$ клеток/мкл и свыше $9,8 \times 10^3$ клеток/мкл должны быть подготовлены к анализу соответствующим образом. Если результат подсчета превышает $9,8 \times 10^3$ клеток/мкл, необходимо разбавить образец 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.
4. Факторы, которые влияют на свойства клеток крови, например лекарственные препараты, могут приводить к получению неточных результатов. Например, плохое разделение отрицательных и положительных клеток может наблюдаться у пациентов с трансплантированными тканями, получающих иммунодепрессанты. В случае плохого разделения отрицательных и положительных кластеров результаты анализа следует отклонить (см. раздел 12 «Поиск и устранение неисправностей» в конце данной инструкции-вкладыша). Если значения общей процентной доли Т-лимфоцитов в любых двух из трех пробирок, содержащих CD3, отличаются более чем на 8 %, анализ следует отклонить.
5. Лаборатории должны установить свои собственные диапазоны нормальных значений для каждого параметра Simultest IMK Plus, на которые могут оказывать влияние пол и возраст пациента, а также методика 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.

-
6. Если результаты должны быть выражены как абсолютные количества, для того же образца крови должен быть выполнен независимый дифференциальный подсчет и анализ лейкоцитов. Не используйте для расчета абсолютных количеств результаты дифференциального подсчета, приведенные в отчете программы Simultest IMK Plus. Печатаемые программой Simultest IMK Plus результаты дифференциального подсчета следует использовать исключительно для сравнения с результатами независимого лабораторного 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 IMK Plus для получения абсолютных количеств.

Если результат дифференциального подсчета лимфоцитов, полученный в программе Simultest IMK Plus, отличается от результата независимого дифференциального подсчета лейкоцитов более чем на $\pm 10\%$, это свидетельствует о значительном несоответствии результатов; следует с осторожностью интерпретировать такие результаты подсчета абсолютных количеств. Или результат дифференциального подсчета Simultest IMK Plus, или результат лабораторного дифференциального подсчета лейкоцитов является неверным. См. пункт «Контроль качества» раздела 7 «Процедура».

7. Автоматическое или ручное изменение настроек гейта анализа лимфоцитов изменит относительные количества анализируемых субпопуляций. Программа Simultest IMK Plus использует пробирку LeucoGATE (A) для установки гейта анализа лимфоцитов, который

пропускает не менее 95 % общего количества лимфоцитов в образце. Для утверждения выполненной установки гейта требуется визуальная проверка.

8. Нарушения состояния здоровья не всегда сопровождаются аномальным процентным содержанием Т- или В-лимфоцитов или их субпопуляций. То есть, у больного и у здорового человека может быть одинаковое процентное содержание Т- или В-лимфоцитов. Результаты, полученные в Simultest IMK Plus, должны использоваться в комплексе с другой информацией, полученной при клиническом обследовании и дополнительных независимых диагностических процедурах.
9. Информация, полученная с помощью данного набора, должна сочетаться с другой информацией и интерпретироваться квалифицированным врачом с целью определения наличия или отсутствия патологического состояния.
10. Необходимо учитывать, что нижняя граница диапазона нормальных значений, установленного компанией BD для иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$), составляет менее 1,0 (см. таблицу 3 в пункте «Субпопуляции лейкоцитов» раздела 10 «Ожидаемые значения»).
11. При использовании функции Quadrant Correction в программе Simultest IMK Plus предполагается что все нелимфоцитарные клетки являются неокрашенными. Поэтому, $CD4$ -положительные моноциты, отображающиеся в Q4, будут подсчитаны как $CD4$ -положительные лимфоциты. Предел контаминации моноцитами, при превышении которого образец

отмечается флагом, составляет 4 %. Более подробную информацию о функции коррекции по квадрантам см. в *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*.

12. Необходимо учитывать, что некоторые антитела Simultest IMK Plus реагируют с другими, нелимфоцитарными форменными элементами крови. См. пункт «Перекрестная реактивность» раздела 11 «Рабочие характеристики».
13. Значения иммунорегуляторного индекса, определяемые системами CONSORT 30 или CONSORT 32 с программой Simultest IMK Plus, могут различаться вследствие изменений в субпопуляциях CD8⁺ лимфоцитов, которые также положительны к CD16 или CD56. Популяцию, являющуюся причиной этих изменений, можно определить с помощью двойного флуоресцентного анализа с использованием каждого из этих антител с CD8.
14. Образцы с ядродержащими эритроцитами могут быть лизированы не полностью, так как реагент G (лизирующий раствор) может не лизировать ядродержащие эритроциты. Это 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 20 %, программа отметит образец флагом «too many nonlymphs in gate» (чрезмерное количество нелимфоцитарных элементов в гейте). Компания BD рекомендует отклонять такие результаты. При включенной

функции Quadrant Correction (коррекция по квадрантам) предполагается, что нелимфоцитарные клетки, такие как ядросодержащие или нелизированные эритроциты, определяемые с помощью LeucoGATE, являются неокрашенными, и программа вычитает их из квадранта Q3.

15. Программа Simultest IMK Plus проверяет на предмет антиген-неспецифического связывания антител только контрольную пробирку В. Оператор должен проверить распечатки остальных пробирок (С—F) на предмет каких-либо признаков антиген-неспецифического связывания антител. Например, если в квадранте Q2 точечного графика для пробирки С наблюдается чрезмерное количество событий, следует предполагать наличие антиген-неспецифического связывания антител. Наличие антиген-неспецифического связывания антител может свидетельствовать об изменении состава реагентов или ошибке при подготовке образцов. Анализ таких образцов следует повторить.
16. Присутствие аномальных (бластных) клеток может мешать правильно установить гейт анализа лимфоцитов с помощью LeucoGATE. Программа отметит такой образец флагом и не будет печатать его результаты.
17. Избыточное воздействие (дольше 12 минут) реагента G (лизирующего раствора) на клетки в образцах цельной крови может привести к разрушению лейкоцитов (см. параграф 4 пункта «Окрашивание и фиксация клеток» раздела 7 «Процедура»).

-
18. Способность проточного цитометра включать в подсчет лимфоциты и удалять из него тромбоциты, эритроциты, дебрис, гранулоциты и моноциты зависит от наличия четких границ между этими форменными элементами и лимфоцитами на графике FSC относительно SSC. При анализе образцов некоторых пациентов эти границы получаются нечеткими и гейтирование лейкоцитов будет менее эффективным.
19. Рабочие характеристики метода определялись с помощью проточных цитометров BD FACScan. Рабочие характеристики для каких-либо других приборов не определялись.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Субпопуляции лейкоцитов

Для каждой пробирки, включая контрольную пробирку В, выполняется четыре подсчета. Результаты каждого подсчета отображаются в разных квадрантах на экране FACScan (рис. 2).

Популяции клеток в каждом квадранте для разных пробирок представлены на рис. 3 данной инструкции-вкладыша, а также в *Руководстве пользователя Simultest IMK Plus*. Клинически значимые результаты приводятся в отчете лечащего врача.⁶⁹ По данным компании BD, полученным при исследовании периферической крови 304 здоровых доноров женского и мужского пола в возрасте от 20 до 70 лет, среднее значение иммунорегуляторного индекса составило 1,4, а 95 % диапазон этого индекса составил 0,6—2,8.⁶⁹

Компания BD установила диапазоны нормальных значений для параметров, определяемых Simultest IMK Plus, исследовав с помощью проточного цитометра 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 при анализе лизированной цельной крови представлены в таблице 3.⁶⁹ Диапазоны представлены как скорректированные процентные доли лимфоцитов.

Были также изучены отличия между полученными диапазонами в зависимости от места проведения исследования, а также пола и возраста пациентов. Для каждого параметра Simultest IMK Plus было проведено непараметрическое сравнение значений, полученных в каждом из центров, значений для пациентов мужского пола со значениями пациентов для женского пола, а также значений пациентов в возрасте от 18 до 40 лет со значениями пациентов в возрасте от 41 до 70 лет. Если в результате сравнения были обнаружены значительные различия, данные группы не вносились в общую массу данных, и по ним рассчитывались отдельные диапазоны. Диапазон нормальных значений для процентной доли положительных клеток рассчитывался по эмпирически подобранному распределению.⁶⁹ Возможность объединения диапазонов нормальных значений для параметров IMK Plus (таблица 3) является свидетельством воспроизводимости результатов между лабораториями.

Диапазоны нормальных значений общего содержания Т-лимфоцитов, определяемого с помощью реагента F, немного, но значимо, отличаются в зависимости от пола. Также отличаются в зависимости от пола и возраста (группа до 40 лет включительно от группы старше 40) диапазоны для Т-хелперов/индукторов, иммунорегуляторного индекса (соотношения $CD4^+/CD8^+$), активированных Т-лимфоцитов и NK-лимфоцитов.

Таблица 3. Репрезентативные нормальные диапазоны* для параметров Simultest IMK Plus при исследовании крови взрослых доноров с нормальными гематологическими характеристиками, выраженные как процентные доли в общем количестве лимфоцитов (корректированные). (Данные собраны из шести медицинских центров)

Параметр	Пол	Возраст	n	Среднее значение	95 % диапазон†
Общее количество Т-лимфоцитов	Мужской	18—70	161	71,3	58,2—84,3
	Женский	18—70	143	73,9	62,8—85,0
Общее количество В-лимфоцитов	Оба	18—70	319	14,0	7,1—23,3
Хелперы/ индукторы	Мужской	≤ 40	77	39,9	27,3—52,5
	Мужской	> 40	84	43,9	28,5—59,2
	Женский	≤ 40	85	44,0	31,4—56,7
	Женский	> 40	58	48,9	34,0—63,8
Супрессоры/ цитотоксические лимфоциты	Оба	18—70	304	33,4	18,9—47,9
Иммунорегуляторный индекс	Мужской	≤ 40	77	1,2	0,6—2,2
	Мужской	> 40	84	1,5	0,6—3,0
	Женский	≤ 40	85	1,3	0,7—2,3
	Женский	> 40	58	1,7	0,8—3,3
Активированные Т-лимфоциты	Мужской	≤ 40	58	9,4	3,5—20,6
	Мужской	> 40	67	11,0	3,6—25,9
	Женский	≤ 40	64	7,8	2,8—17,3
	Женский	> 40	44	9,1	4,2—17,2
NK-лимфоциты	Мужской	≤ 40	80	13,2	5,4—27,1
	Мужской	> 40	88	16,3	6,7—33,5
	Женский	≤ 40	91	12,3	4,8—26,1
	Женский	> 40	60	13,6	6,0—26,7

* Данные были получены с помощью реагентов Simultest IMK Plus, программного обеспечения IMK Plus и прибора FACScan.

† 95 % диапазон был рассчитан путем построения графика соответствующего распределения данных и оценки центральных 95 % этого графика.

Диапазоны нормальных значений для взрослых не следует использовать при анализе образцов крови пациентов детского возраста (до 13 лет). На основании предварительных результатов, полученных при исследовании 50 образцов пациентов детского возраста (новорожденных

и детей), можно предположить, что процентная доля общего содержания В-лимфоцитов у детей немного выше, чем у взрослых. У детей в возрасте до одного года также наблюдается тенденция к значительно более низкому общему содержанию Т-лимфоцитов.

При определении диапазонов нормальных значений возможно следует учитывать расовую принадлежность,⁷⁰ однако компания BD не имеет для этого достаточных данных. Компания BD приводит более чем по одному значению для верхней и нижней границ диапазонов большинства параметров Simultest IMK Plus (таблица 3), так как были учтены возрастные и половые различия.

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.

Абсолютные количества

Система BD FACScan/CONSORT 30 или 32 с помощью программы Simultest IMK Plus автоматически рассчитывает абсолютные количества, если были получены и введены в программу значения лейкоцитов и дифференциальные процентные доли лимфоцитов или абсолютное количество лимфоцитов.

ПРИМЕЧАНИЕ. Не используйте для расчета абсолютных количеств результаты дифференциального подсчета трех фракций, полученные в программе Simultest IMK Plus. Получаемые программой IMK Plus 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 IMK Plus для получения абсолютных количеств.

Значения абсолютных количеств, полученные в разных лабораториях, как правило, значительно различаются в зависимости от используемого метода подсчета лейкоцитов и дифференциального подсчета лейкоцитов.

Репрезентативные значения абсолютных количеств приведены в таблице 4. Таблица составлена на основании данных, полученных в Laboratoire d'Hématologie, Ecole de Santé Publique, Université Catholique de Louvain, Бельгия, где исследовалась самая большая группа доноров в возрасте от 20 до 70 лет. Эта группа представляет выбранную популяцию в возрасте 20 до 70 лет, к которой применялся критерий $T + B + NK = 100 \pm 5 \%$. Параметры Simultest IMK Plus были выражены как процентная доля лимфоцитов в рамках гейта анализа после вычитания нелимфоцитарных клеток (гранулоцитов, моноцитов и дебриса) из квадранта 3.

**Таблица 4. Репрезентативные нормальные диапазоны*
для параметров Simultest IMK Plus при исследовании крови
взрослых доноров с нормальными гематологическими
характеристиками (результаты подсчета абсолютных количеств
получены в одном медицинском центре)**

Параметр	Пол	Возраст	n	Среднее значение	95 % диапазон†
Лейкоцитов	Оба	20—70	98	6,08‡	3,45—9,76‡
% лимфоцитов	Оба	20—70	98	30,96‡	20,7—44,6‡
Общее количество Т-лимфоцитов	Мужской	20—70	40	1,31	0,594—1,992
	Женский	20—70	55	1,39	0,772—2,201
Общее количество В-лимфоцитов	Оба	20—70	98	0,27	0,109—0,532
Хелперы/ индукторы	Мужской	≤ 40	11	0,77	0,439—1,112
	Мужской	> 40	29	0,82	0,356—1,351
	Женский	≤ 40	27	0,86	0,309—1,571
	Женский	> 40	28	0,86	0,496—1,354
Супрессоры/ цитотоксические лимфоциты	Оба	20—70	95	0,58	0,282—0,999
Иммунорегуляторный индекс	Мужской	≤ 40	11	1,28	0,865—1,885
	Мужской	> 40	29	1,57	0,784—3,100
	Женский	≤ 40	27	1,37	0,775—2,375
	Женский	> 40	28	1,84	0,846—3,500
Активированные Т-лимфоциты	Мужской	≤ 40	11	0,14	0,050—0,268
	Мужской	> 40	30	0,17	0,042—0,451
	Женский	≤ 40	29	0,12	0,034—0,321
	Женский	> 40	28	0,15	0,054—0,496
NK-лимфоциты	Мужской	≤ 40	11	0,19	0,078—0,345
	Мужской	> 40	30	0,26	0,102—0,511
	Женский	≤ 40	29	0,21	0,072—0,543
	Женский	> 40	28	0,23	0,106—0,605

* Данные были получены с помощью реагентов Simultest IMK Plus, программного обеспечения IMK Plus и прибора FACScan.

† 95 % диапазон определяли непосредственно из данных, используя процентиля 2,5 и 97,5.

‡ Данные получены с помощью Technicon™ H6000 (результаты подсчета выражены как 1×10^3 лейкоцитов/мкл). (Technicon является товарным знаком компании Miles Instruments).

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики Simultest IMK Plus определялись путем проведения испытаний в одном медицинском центре США и/или лабораториях компании BD в Сан-Хосе, штат Калифорния.

Воспроизводимость результатов в рамках образца

Были получены образцы крови пяти здоровых и пяти больных доноров. Образцы были разделены на аликвоты (четыре для здоровых и три для больных), окрашены реагентами Simultest IMK Plus, лизированы и зафиксированы не позднее, чем через 2 часа после окрашивания. Анализ методом проточной цитометрии выполнялся в проточном цитометре FACScan в той же лаборатории не позднее, чем через 24 часа. В таблице 5 представлены средние значения воспроизводимости результатов в рамках образца для образцов здоровых и больных доноров.

Воспроизводимость результатов между приборами

Следуя протоколу, аналогичному описанному выше, образцы цельной крови десяти здоровых доноров были разделены на аликвоты, окрашены реагентами Simultest IMK Plus и лизированы. Отдельные образцы от каждого донора анализировали на трех разных проточных цитометрах FACScan. Полученные результаты представлены в таблице 6.

Воспроизводимость результатов между лабораториями

О воспроизводимости результатов между лабораториями свидетельствует возможность объединения нормальных диапазонов параметров, определяемых с помощью IMK Plus (таблица 3).

Сравнение Simultest IMK Plus с другими методами

Аликвоты одних и тех же образцов от здоровых и больных доноров анализировались с помощью реагентов Simultest IMK Plus, набора Simultest Immune Monitoring,* CD3 FITC и CD19 PE с использованием лизированной цельной крови и прибора FACScan. Сравнение результатов проводилось методом линейного регрессионного анализа. Обзор результатов представлен в таблице 7.

Стабильность окрашенных клеточных образцов

Были получены и проанализированы в проточном цитометре FACScan образцы клеток пяти здоровых доноров. Подготовленные образцы хранились в течение 24 часов при температуре 2—8 °C в темноте, а затем повторно анализировались методом проточной цитометрии. Исследования не показали значимых различий между измерениями в 0 и 1 день ни по одному из параметров. Компания BD рекомендует выполнять анализ окрашенных образцов не позднее, чем через 24 часа после окрашивания.

* Патент США № 4 599 307.

**Таблица 5. Воспроизводимость результатов в рамках образца
для параметров Simultest IMK Plus
(пять здоровых и пять больных доноров);
процентные доли лимфоцитов
(корректированные)**

Параметр	Доноры	n	Среднее значение*	SD†	CV‡	df§
Общее количество Т-лимфоцитов	Норма	5	68,4	1,6	2,2	14 [#]
	Патология	5	80,4	1,9	2,0	15 [#]
Общее количество В-лимфоцитов	Норма	5	9,5	2,4	21,5	14
	Патология	5	9,3	1,0	9,0	15
Хелперы/индукторы	Норма	5	46,3	1,5	3,2	15
	Патология	5	18,8	2,1	12,2	15
Супрессоры/цитотоксические лимфоциты	Норма	5	34,8	1,3	3,6	15
	Патология	5	65,5	2,6	3,7	15
Иммунорегуляторный индекс	Норма	5	1,4	0,1	5,2	15
	Патология	5	0,3	0,04	13,4	15
Активированные Т-лимфоциты	Норма	5	6,4	1,5	24,5	15
	Патология	5	38,9	1,6	4,3	15
NK-лимфоциты	Норма	5	24,7	2,0	7,0	14 [#]
	Патология	5	12,6	0,9	6,7	15

* Среднее — сводное среднее, т. е. $\bar{Y}$ = среднее значение отдельно взятых средних значений.

† SD — стандартное отклонение, сводное стандартное отклонение.

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2 + \dots + (n_k - 1) \times s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$$

s_i^2 — дисперсия каждого i-го образца для $1 \leq i \leq k$.

k — количество образцов.

n — количество исследований одного образца.

‡ CV — коэффициент вариации = $\frac{SD}{\bar{Y}} \times 100$.

§ df — количество степеней свободы = (количество повторов — количество средних значений для донора) × количество доноров; т.е. 4 аликвоты — 1 среднее = 3 степени свободы. Три степени свободы для 5 доноров = 15 степеней свободы или (1 аликвота × 3 прибора) — 1 среднее = 2 степени свободы. Две степени свободы для 10 доноров = 20 степеней свободы.

Один из повторов был отклонен врачом.

Таблица 6. Воспроизводимость результатов между приборами для параметров Simultest IMK Plus (десять здоровых доноров); процентные доли лимфоцитов (корректированные)

Параметр	Среднее значение*	SD†	CV‡	df§
Общее количество Т-лимфоцитов	72,1	2,13	2,29	20
Общее количество В-лимфоцитов	12,7	1,26	10,59	20
Хелперы/индукторы	45,8	1,26	2,47	20
Супрессоры/цитотоксические лимфоциты	39,0	1,37	3,28	20
Иммунорегуляторный индекс	1,2	0,06	4,80	20
Активированные Т-лимфоциты	11,8	1,56	14,09	20
NK-лимфоциты	16,8	1,28	6,93	20

* Среднее — сводное среднее, т. е. $\bar{Y}$ = среднее значение отдельно взятых средних значений.

† SD — стандартное отклонение, сводное стандартное отклонение.

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2 + \dots + (n_k - 1) \times s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$$

s_i^2 — дисперсия каждого i-го образца для $1 \leq i \leq k$.

k — количество образцов.

n — количество исследований одного образца.

‡ CV — коэффициент вариации = $\frac{SD}{\bar{Y}} \times 100$.

§ df — количество степеней свободы = (количество повторов – количество средних значений для донора) x количество доноров; т.е. 4 аликвоты – 1 среднее = 3 степени свободы. Три степени свободы для 5 доноров = 15 степеней свободы или (1 аликвота x 3 прибора) – 1 среднее = 2 степени свободы. Две степени свободы для 10 доноров = 20 степеней свободы.

Таблица 7. Сравнение Simultest IMK Plus с другим методом с использованием лизированной цельной крови и прибора FACScan

Параметр	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	r	n*	Диапазон данных (%)
Общее количество Т-лимфоцитов [†]	0,98	4,06	0,98	58	10—90
Общее количество В-лимфоцитов [‡]	0,97	1,47	0,99	65	0—80
Хелперы/индукторы [‡]	1,16	-1,81	0,96	31	10—60
Супрессоры/цитотоксические лимфоциты [§]	0,96	7,05	0,93	31	25—80
Иммунорегуляторный индекс [§]	1,02	-0,02	0,98	31	0,125—2,0
Активированные Т-лимфоциты [§]	1,06	0,34	0,92	27	5—50

* Включает нормальные и патологические образцы.

† Определено CD3 FITC.

‡ Определено CD19 PE.

§ В сравнении с набором Simultest Immune Monitoring.

Перекрестная реактивность

Специфичность моноклональных антител в зависимости от номера кластера дифференцировки (CD) была установлена путем слепого тестирования в ряде лабораторий группой International Leucocyte Workshop Group.^{25, 27, 34, 38, 42, 64, 65}

Антитело к CD4 реагирует с моноцитами и лимфоцитами.⁴⁷ Антитело Anti-HLA-DR реагирует с моноцитами/макрофагами, а также В-лимфоцитами.^{14, 19, 57—60} Антитело к CD14 реагирует с гранулоцитами и моноцитами/макрофагами.³³ Антитело к CD16 слабо реагирует с нейтрофилами.²⁰ Возможность влияния гранулоцитов на результат подсчета лимфоцитов следует устранить на основе характеристик светорассеяния.

Несмотря на то что реагент В разработан для выявления антиген-неспецифического связывания антител, неспецифическое связывание вследствие плохого состояния клеток возможно при использовании любого реагента на основе антител. Наличие антиген-неспецифического связывания антител можно предположить, если на графике флуоресценции нет четкой границы между положительными и отрицательными клетками, или же если более 5 % подсчитанных клеток отрицательного контроля находится за пределами 3 квадранта. Описание мер по устранению антиген-неспецифического связывания приведено в 12 разделе «Поиск и устранение неисправностей» в конце данной инструкции-вкладыша.

Линейность и выход

Все партии реагентов Simultest IMK Plus стандартизованы по действительным клеточным суспензиям таким образом, что их оптимальные рабочие характеристики реализуются при концентрации клеток $1,0 \times 10^6$ лейкоцитов/образец. Для образцов лизированной цельной крови диапазон нормальных значений составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл. Линейность результатов ожидается в диапазоне от $3,5 \times 10^3$ до $9,8 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл.

12. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина
Недостаточное разделение популяций с положительной и отрицательной флуоресценцией.	1) Слабая флуоресценция вследствие неправильной установки напряжения ФЭУ или коэффициента усиления. 2) Недостаточное количество реагента на основе антител.
Нет разделения между кластерами дебриса и лимфоцитов на точечном графике светорассеяния.	1) Чрезмерное количество тромбоцитов, ядросодержащих или нелизированных эритроцитов. 2) Неправильно установлен коэффициент усиления. 3) Образец был окрашен позднее, чем через 6 часов после забора. 4) Установлен слишком высокий или низкий порог FSC.
Неоптимальная эффективность окрашивания антителом.	1) Образец был окрашен позднее, чем через 6 часов после забора. 2) Гейт анализа, выбранный программой, пропускает слишком много нелимфоцитарных событий. 3) Неправильно установлены маркеры флуоресценции.

Решение

- 1) Выполнить программу AutoCOMP с калибровочными CaliBRITE Beads. Интенсивность в каналах флуоресценции должна соответствовать спецификациям.
 - 2) Проверить калибровку микропипеточного дозатора, объем добавленного реагента, а также объем и концентрацию добавленных клеток. Проверить условия хранения реагентов.
-
- 1) Повторно окрасить свежий образец. Промыть клетки на более низкой скорости, например при 100 x g, в течение 15 минут при комнатной температуре (20—25 °C).
 - 2) Настроить коэффициент усиления таким образом, чтобы левый край кластера лимфоцитов начинался приблизительно в канале 50 (по 256-канальной шкале). Это особенно важно при переходе от настройки/компенсации в программе AutoCOMP к выполнению измерений в цельной крови. См. соответствующее руководство пользователя или руководство по эксплуатации прибора.
 - 3) Получить свежий образец для окрашивания.
 - 4) Отрегулировать порог FSC таким образом, чтобы получить приблизительно 10 каналов дебриса (по 256-канальной шкале).
-
- 1) Получить свежий образец для окрашивания.
 - 2) Повторно обработать данные с помощью программы CONSORT 30, LYSYS™ II или SimulSET™ и установить гейт вручную. ПРИМЕЧАНИЕ. Узкий гейт может не пропускать крупные лимфоциты, например NK-лимфоциты или лимфобласты. Если возможно, повторно получите данные для образцов после оптимизации рассеяния, то есть настройки напряжения ФЭУ канала SSC, коэффициента усиления FSC и порога FSC, с целью отделения кластеров лимфоцитов от дебриса. См. соответствующее руководство пользователя программного обеспечения.
 - 3) Повторно обработать данные с помощью программы CONSORT 30, LYSYS II или SimulSET и установить маркеры флуоресценции вручную.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ (продолжение)

Проблема	Возможные причины
Программа не может надлежащим образом установить гейт лимфоцитов.	1) Низкое содержание лимфоцитов в образце. 2) Установлен слишком высокий или низкий порог FSC. 3) Неправильно установлен коэффициент усиления. 4) Образец был окрашен позднее, чем через 6 часов после забора. 5) Программная установка маркеров неприемлема.
Неокрашенные клетки в окрашенном образце находятся над маркером, установленным с помощью контрольной пробирки В, в Q4 или Q1.	1) Антиген-неспецифическое связывание антител вследствие наличия в образце мертвых или поврежденных клеток. 2) Антиген-неспецифическое связывание антител вследствие наличия Fc-рецепторов.
Тусклое или неравномерное окрашивание.	1) Слишком высокая концентрация клеток на этапе окрашивания. 2) Недостаточное количество реагента. 3) Клетки анализировались позднее, чем через 24 часа после окрашивания. 4) Неподходящий состав среды (нет азида).
Клеток мало или нет вообще.	1) Слишком низкая концентрация клеток. 2) Неисправность проточного цитометра.
Повышенная автофлуоресценция.	1) Возможно бактериальное загрязнение фосфатно-солевого буфера (PBS) или фиксатора. 2) Плохо выполнена подготовка образца.
Слабая положительная флуоресценция.	Возможно бактериальное загрязнение PBS буфера или фиксатора. Неподходящий pH буфера или фиксатора.

Решение

- 1) Повысить концентрацию клеток методом выделения в градиенте плотности или повторно получить большее количество событий с помощью программы CONSORT 30 или LYSYS II.
- 2) Отрегулировать порог FSC таким образом, чтобы получить приблизительно 10 каналов дебриса (по 256-канальной шкале).
- 3) Настроить коэффициент усиления таким образом, чтобы левый край кластера лимфоцитов начинался приблизительно в канале 50 (по 256-канальной шкале). Это особенно важно при переходе от настройки/компенсации в программе AutoCOMP к выполнению измерений в цельной крови. См. соответствующее руководство пользователя.
- 4) Получить свежий образец для окрашивания.
- 5) Повторно получить данные с помощью CONSORT 30 или LYSYS II.

- 1) Получить свежий образец для окрашивания.
- 2) Проверить гейт анализа лимфоцитов на предмет избыточной контаминации моноцитами, гранулоцитами или дебрисом.

- 1) Проверить и довести до нужного уровня концентрацию клеток; повторить окрашивание с использованием свежего образца.
- 2) Повторить окрашивание с надлежащим количеством реагента.
- 3) Повторить окрашивание со свежим образцом; провести анализ без задержки.
- 4) Использовать азид в среде для окрашивания и на этапе промывки.

- 1) Подготовить свежий образец с более высокой концентрацией. Повторить окрашивание и анализ.
- 2) Провести поиск и устранение неисправностей прибора.

- 1) Приготовить свежий PBS с водой класса ЧДА и свежий фиксатор. Отфильтровать PBS и фиксатор через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.
- 2) Получить и окрасить свежий образец.

Приготовить свежий PBS с водой класса ЧДА и свежий фиксатор с PBS с азидом. Довести pH до нужного уровня. Отфильтровать через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolde-Mariam W, Peter J. Recent diagnostic advances in cellular immunology. *Diagnost Med.* 1984;7:25-32.
2. Henry C, Mishell B, Shiigi S. Hemolytic plaque assays. In: Mishell B, Shiigi S, ed. *Selected Methods in Cellular Immunology*. New York: WH Freeman and Co; 1980:69-123.
3. Grabstein K, Chen Y. Cell-mediated cytolytic responses. In: Mishell B, Shiigi S, ed. *Selected Methods in Cellular Immunology*. New York: WH Freeman and Co; 1980:124-137.
4. Wofsy L, Henry C, Kimura J, North J. Modification and use of antibodies to label cell surface antigens. In: Mishell B, Shiigi S, ed. *Selected Methods in Cellular Immunology*. New York: WH Freeman and Co; 1980:287-304.
5. Jackson A, Warner N. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose N, Friedman H, Fahey J, ed. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
6. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newsletter.* 1990;10:43-55.
7. Nicholson J, Jones B. Immunophenotyping by flow cytometry: its use in HIV infection. *Labmedica.* 1989;6:21-26.
8. Landay A, Muirhead K. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989;52:48-60.
9. Schmidt R. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut.* 1989;59:200-206.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. Legendre C, Schiffrin A, Weitzner G, Colle E, Guttman R. Two color flow cytometry analysis of activated T-lymphocyte subsets in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes*. 1988;37:792-795.
14. Tomkinson B, Wagner D, Nelson D, Sullivan J. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J Immunol*. 1987;139:3802-3807.
15. 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.
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;131:1789-1796.
17. Giorgi J, Hultin L. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newsletter*. 1990;10:55-61.
18. 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;63:1416-1423.
19. 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 Immunopath*. 1986;38:161-177.
20. Lanier L, Le A, Civin C, Loken M, Phillips J. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
21. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. In: Ades E, Lopez C, ed. *Natural Killer Cells and Host Defense*. Basel: Karger; 1989:1.
22. Aiuti F, Sirianni M, Mezzaroma I, et al. HIV-1 infection: epidemiological features and immunological alterations during the natural history of the disease. *Clin Immunol Immunopath*. 1989;50:S157-S165.
23. Jandl J. Blood and blood forming tissues. In: Jandl J, ed. *Blood Textbook of Hematology*. Boston, Mass: Little Brown and Company; 1987:1-48.
24. Beverley P. Production and use of monoclonal antibodies in transplantation immunology. In: Touraine J, Trager J, Betuel H, et al., ed. *Transplantation and Clinical Immunology XI*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1980:87-94.

-
25. Cobbold S, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael A, ed. *Leucocyte Typing III*. New York, NY: Oxford University Press; 1986:788-803.
 26. Rowe D, Beverley P. Characterisation of breast cancer infiltrates using monoclonal antibodies to human leucocyte antigens. *Br J Cancer*. 1984;49:149-159.
 27. 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: M2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman S, ed. *Leucocyte Typing*. Berlin: Springer-Verlag; 1984:82-108.
 28. Dimitriu-Bona A, Burmester G, Waters S, Winchester R. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1983;130:145-152.
 29. Herrmann F, Komischke B, Odenwald E, Ludwig W. Use of monoclonal antibodies as a diagnostic tool in human leukemia. I. Acute myeloid leukemia and acute phase of chronic myeloid leukemia. *Blut*. 1983;47:157-163.
 30. Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, ed. *Leucocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
 31. Goyert S, Tesio L, Ashman L, et al. Report on the CD14 Cluster Workshop. In: Knapp W, ed. *Leucocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:789-794.
 32. Bernstein I, Self S. Joint report of the myeloid section of the Second International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, ed. *Leukocyte Typing II: Human Myeloid and Hematopoietic Cells*. New York: Springer-Verlag; 1984:1-25.
 33. Jayaram Y, Hogg N. Surface expression of CD14 molecules on human neutrophils. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al., ed. *Leucocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:796-797.
 34. 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, ed. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York: Springer-Verlag; 1986:3-30.
 35. 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.

-
36. 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.
 37. Knowles R. Immunochemical analysis of the T cell-specific antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, ed. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York: Springer-Verlag; 1986:259-288.
 38. Nadler L. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and comments. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, ed. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York: Springer-Verlag; 1986:3-43.
 39. 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.
 40. Lanier L, Federspiel N, Ruitenberg J, et al. The T cell antigen receptor complex expressed on normal peripheral blood CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes. *J Exp Med.* 1987;165:1076-1094.
 41. Dorken B, Moller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Molderhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, ed. *Leukocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1986:34-36.
 42. 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, Dausett J, Milstein C, Schlossman S, ed. *Leukocyte Typing*. Berlin: Springer-Verlag; 1984:25-60.
 43. 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;78:544-548.
 44. 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.
 45. 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.* 1984;312:763-767.
 46. Kurrle R. Cluster report: CD3. In: Knapp W, ed. *Leukocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:290-293.
 47. Wood G, Warner N, Warnke R. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol.* 1983;131:212-216.
 48. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman S. Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *J Immunol.* 1987;139:678-682.

-
49. Eichmann K, Johnson J-I, Falk I, Emrich F. Effective activation of resting mouse T lymphocytes by cross-linking submitogenic concentrations of the T cell antigen receptor with either LyT-2 or L3T4. *Eur J Immunol.* 1987;17:643-650.
 50. Gallagher P, Fazekas 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.
 51. 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, Dorken B, Gilks W, et al., ed. *Leucocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
 52. Terry L, Disanto J, Small T, Flomenberg N. Differential expression of the CD8 and LyT-3 antigens on a subset of human T-cell receptor γ/δ -bearing lymphocytes. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al., ed. *Leucocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:345-346.
 53. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al., ed. *Leucocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
 54. Lampson L, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol.* 1980;125:293-299.
 55. Brodsky F. 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.
 56. Robbins P, Evans E, Ding A, Warner N, Brodsky F. Monoclonal antibodies that distinguish between Class II antigens (HLA-DP, DQ, and DR) in 14 haplotypes. *Human Immunol.* 1987;18:301-313.
 57. Terstappen L, Hollander Z, Meiners H, Loken M. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol.* 1990;48:138-148.
 58. Warnke R, 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.
 59. Engleman E, Warnke R, Fox R, Dilley J, Benike C, Levy R. Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:1791-1795.

-
60. Edwards J, Durant B, Jones D, Evans P, Smith J. Differential expression of HLA Class II antigens in fetal human spleen: relationship of HLA-DP, DQ, and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol.* 1985;137:479-490.
 61. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol.* 1983;130:2133-2141.
 62. Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol.* 1983;130:2142-2148.
 63. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1984;133:180-189.
 64. Schmidt R. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al., ed. *Leucocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
 65. Schubert J, Lanier L, Schmidt R. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al., ed. *Leucocyte Typing IV*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
 66. Knapp W, Rieber P, Dörken B, Schmidt R, Stein H, van der Borne A. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol Today.* 1989;10:253-258.
 67. Lanier L, Testi R, Bindl J, Phillips J. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med.* 1989;169:2233-2238.
 68. Slockbower J, Belgeri K, Bruck E, et al. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3-A2)*. Villanova: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1984.
 69. Reichert T, DéBruyere M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath.* 1991;60:190-208.
 70. Prince H, Hirji K, Waldbeser L, Plaeger-Marshall S, et al. 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.

ГАРАНТИЯ

Для продаваемого согласно данным условиям продукта гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке на момент доставки заказчику. Отвергаются любые явные или подразумеваемые гарантии, которые выходят за рамки описания, приведенного на этикетке данного продукта. Вся ответственность компании BD ограничивается либо заменой продуктов, либо возмещением цены покупки. Компания BD не несет ответственности за повреждение имущества, травмы или экономические убытки, вызванные данным продуктом.

ИНФОРМАЦИЯ О ПОДДЕРЖКЕ КЛИЕНТОВ



Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

San Jose, CA 95131

Тел.: 877-232-8995

Факс: 408-954-2347

ClinicalApplications@bd.com

BD Biosciences

Поддержка клиентов в Европе

Тел.: 322-400-9895

Факс: 322-401-7094

help.biosciences@europe.bd.com



BENEX Limited

Rineanna House

Shannon Free Zone

Shannon, County Clare

Ирландия

Тел.: 353-61-472920

Факс: 353-61-472907

bdbiosciences.com