



TriTest CD4 FITC/ CD8 PE/CD3 PerCP Reagent

50 тестов на флакон — кат. № 342414

50 тестов на флакон с пробирками

TruCOUNT — кат. № 342445

Для определения абсолютных значений Т-хелперов/Т-индукторов, Т-супрессоров/Т-киллеров и общего количества лимфоцитов в лизированной цельной крови человека

8/2010

23-13747-01



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



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences

San Jose, CA 95131

Тел.: 877-232-8995

Факс: 408-954-2347

ClinicalApplications@bd.com



BENEX Limited

Rineanna House

Shannon Free Zone

Shannon, County Clare

Ирландия

Тел.: 353-61-472920

Факс: 353-61-472907

BD Biosciences

Поддержка клиентов в Европе

Тел.: 322-400-9895

Факс: 322-401-7094

help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

BD TriTEST™ CD4 флуоресцеина изотиоцианат (FITC)/CD8 фикоэритрин (PE)/CD3 перидинин-хлорофилл протеин (PerCP) представляет собой реагент для прямой трехцветной иммунофлуоресценции, предназначенный для использования с надлежащим образом оснащенным проточным цитометром для идентификации и определения абсолютных значений зрелых человеческих Т-лимфоцитов CD3⁺, Т-хелперов/Т-индукторов CD3⁺CD4⁺ и Т-супрессоров/Т-киллеров CD3⁺CD8⁺ в цельной лизированной крови. При использовании с пробирками TruCOUNT™ подсчет абсолютных значений этих субпопуляций можно выполнить в одной пробирке.

Реагент BD TriTEST и пробирки TruCOUNT можно использовать с загрузчиком BD FACS Loader.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

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

Клиническое применение

Т-хелперы/Т-индукторы — это субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3⁺), экспрессирующих антиген CD4⁺. Абсолютные значения CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов используются для оценки и мониторинга некоторых форм иммунодефицита^{1–3} и аутоиммунных заболеваний.^{4,5} Определение абсолютных значений Т-хелперов/Т-индукторов используется при мониторинге лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).⁶ При прогрессировании инфекции пациенты с ВИЧ, как правило,

показывают устойчивое снижение количества Т-хелперов/Т-индукторов.⁷

Т-супрессоры/Т-киллеры — это субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3⁺), экспрессирующих антиген CD8⁺. Абсолютные значения CD3⁺CD8⁺ используются для оценки и мониторинга некоторых форм иммунодефицита и аутоиммунных заболеваний. Значения Т-супрессоров/Т-киллеров могут выходить за пределы нормального диапазона значений при некоторых аутоиммунных заболеваниях,⁸ и определенных иммунных реакциях, таких как острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ)⁹ и отторжение трансплантата.¹⁰ Субпопуляция CD8⁺ повышена у многих пациентов с врожденным или приобретенным иммунодефицитом, таким как тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД)¹ или синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).⁶ Популяция CD8⁺ клеток часто снижена в активной фазе системной красной волчанки (СКВ), но может быть повышена у пациентов с СКВ при прохождении терапии стероидами.¹¹

Для определения субпопуляций Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов Центрами по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) рекомендуется использовать комбинации реагентов, содержащие антитела CD3.¹² TriTEST CD4/CD8/CD3 reagent позволяет идентифицировать и подсчитать количество Т-хелперов/Т-индукторов отдельно от примеси CD3⁺CD4⁺ моноцитов.^{13—15}

3. ПРИНЦИП МЕТОДА _____

При добавлении цельной крови к реагентам меченные флуорохромом антитела в реагенте специфично связываются с антигенами клеточной поверхности лейкоцитов. В процессе сбора данных клетки проходят через луч лазера и рассеивают его свет. Окрашенные клетки флуоресцируют. Данные сигналы светорассеяния и флуоресценции, обнаруженные прибором, предоставляют информацию о размере клетки, ее внутренней сложности и относительной интенсивности флуоресценции. Реагенты TriTEST активируют флуоресценцию, делая возможным гейтирование популяции лимфоцитов для прямой флуоресценции^{13—15} с целью снизить количество проникновений незонированных или ядросодержащих эритроцитов в гейт.

Определенный объем образца окрашивается непосредственно в пробирке TruCOUNT. Лиофилизированный осадок в пробирке растворяется, высвобождая определенное число флуоресцентных частиц. Во время анализа абсолютное значение (клеток/мкл) положительных клеток в образце определяется путем сравнения частоты событий клеток и частиц. При использовании соответствующего программного обеспечения, например MultiSET™ software, абсолютные значения рассчитываются автоматически. При анализе данных вручную с использованием такого программного обеспечения, как CellQuest™ software, необходимо разделить количество положительных событий клеток на количество событий частиц, а затем умножить на концентрацию частиц TruCOUNT.

4. РЕАГЕНТ

Реагента в комплекте достаточно для проведения 50 анализов

BD TruCOUNT CD4/CD8/CD3 reagent поставляется в 1 мл буферного солевого раствора, содержащего 0,1 % азида натрия. Он содержит меченные флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) антитела CD4, клон SK3,^{16–18} меченные фикоэритрином (PE) антитела CD8, клон SK1,^{16, 17} и меченные PerCP антитела CD3, клон SK7.^{19–21}

CD4 определяет Т-хелперы/Т-индукторы и распознает антиген CD4 молекулярной массой 59 кДа,²² который взаимодействует с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) II класса и является первичным рецептором для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).^{23, 24} Цитоплазматическая порция антигена связана с протеинтирозин-киназой p56^{lck}.²⁵

CD8 выявляет Т-супрессоры/Т-киллеры и распознает антиген, экспрессирующийся на субъединице α массой 32 кДа бимолекулярного комплекса, образованного сшивкой дисульфидными связями.²⁶ Цитоплазматический домен субъединицы α антигена CD8 связан с протеинтирозин-киназой p56^{lck}.²⁵ CD8 взаимодействует с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, что приводит к увеличению адгезии между CD8⁺ Т-лимфоцитами и клетками-мишенями.^{27–29} Связывание антигена CD8 с молекулами ГКГС класса I усиливают активацию покоящихся Т-лимфоцитов.^{27–29}

CD3 выявляет Т-лимфоциты и вступает в реакцию с эпсилон-цепью комплекса рецепторов антигена CD3/антигена Т-клетки (ТкР).³⁰ Этот комплекс состоит из не менее чем шести белков с молекулярной массой от

20 до 30 килодальтон (кДа).³¹ Антиген, распознаваемый антителами CD3, нековалентно связан с α/β или γ/δ субъединицами ТкР (от 70 до 90 кДа).³²

Антитела CD4, CD8 и CD3 состоят из тяжелых γ_1 цепей и легких каппа-цепей мышиного протеина.

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

Меры предосторожности

1. Для диагностики *in vitro*.
2. Не использовать реагент, если наблюдаются какие-либо изменения внешнего вида. Осадок или обесцвечивание свидетельствуют о нестабильности или порче.
3. Реагент антител содержит азид натрия в качестве консерванта. Однако следует принимать меры для исключения микробного загрязнения, которое может приводить к ошибочным результатам.

ОСТОРОЖНО! Азид натрия вреден при приеме внутрь (R22). Хранить в недоступном для детей месте (S2). Держать вдали от пищи, напитков и корма для животных (S13). Использовать подходящую защитную одежду (S36). При попадании внутрь немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите данную упаковку или этикетку (S46). При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Азидные соединения при утилизации необходимо смывать большим количеством воды во избежание

осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно возникновение взрывоопасных условий.

4. **ОСТОРОЖНО!** Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{33, 34} и требуют утилизации с соблюдением надлежащих мер предосторожности в соответствии с федеральными, региональными и местными нормативами. Не выполнять пипетирование ртом. Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки. Насколько известно, фиксация инактивирует ВИЧ.³⁵
5. Необходим лизирующий раствор FACS™ Lysing Solution, содержащий диэтиленгликоль и формальдегид. Предупреждения см. в инструкции-вкладыше упаковки *FACS Lysing Solution*.
6. Для получения правильных результатов критически важным является внесение точного объема крови. Откалибруйте дозаторы, чтобы добавлять ровно 50 мкл образца. Компания BD предлагает электронные дозаторы, работающие в режиме обратного пипетирования (см. № 6 в п. «Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект»). Если этот или аналогичные дозаторы не применяются, используйте технику обратного пипетирования (см. краткое описание в п. «Обратное пипетирование» в разделе 7). Для получения дополнительной информации см. инструкцию производителя дозатора.

7. Содержание частиц в пробирках TruCOUNT разное для каждой партии. Критически важным при введении значения содержания частиц в программное обеспечение или ручном подсчете абсолютного количества является использование значения, которое указано на текущей партии пробирок TruCOUNT. Не используйте пробирки из разных партий при проведении одного анализа.
8. Пробирки TruCOUNT разработаны для использования со специфичной процедурой лизирования без промывания. Для сбора данных не пытайтесь преодолеть порог прямого светорассеяния (FSC).

Хранение и обращение

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

извлечения из пленочного пакета. Не используйте пробирки после даты истечения срока годности, которая указана на упаковке.

5. ПРИБОР

TriTEST CD4/CD8/CD3 reagent и пробирки TruCOUNT предназначены для использования с проточным цитометром, оборудованном соответствующими техническими средствами и программным обеспечением. Компания BD рекомендует проточные цитометры FACSCalibur™, FACSort™ или FACScan™. Однако при использовании других платформ также можно получить результаты. Проточный цитометр должен быть оснащен лазером 488 нм и быть способным определять рассеяние света (прямое и боковое) и трехцветную флуоресценцию с излучением, обнаруживаемом в трех диапазонах: 515—545 нм, 562—607 нм и > 650 нм. Прибор должен обладать возможностью установки порогового уровня или дискриминации с использованием канала > 8 мн. С данным прибором можно также использовать BD FACS Loader.

Компания BD рекомендует использовать частицы CaliBRITETM beads и FACSComp™ software версии 2.0 или более поздней для настройки напряжений фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), компенсации флуоресценции, а также проверки чувствительности прибора перед использованием. Пользователям проточных цитометров производства других компаний (кроме BD) следует обратиться к инструкции производителя по настройке трехцветного иммунофенотипирования.

Компанией BD разработано программное обеспечение, такое как MultiSET software, автоматически рассчитывающее

абсолютные значения при использовании пробирок TruCOUNT. Тем не менее, для сбора данных и анализа можно использовать другое программное обеспечение, а абсолютные значения могут быть рассчитаны вручную.

6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Отберите кровь путем венепункции с соблюдением правил асептики^{36, 37} в стерильную вакуумную пробирку VACUTAINER® с EDTA-K₃ (этилендиаминтетрауксусной кислотой) (бледно-лиловая крышка). TriTEST CD4/CD8/CD3 reagent и пробирки TruCOUNT были проверены на использование как с жидкой, так и с сухой формой EDTA-K₃. Для анализа необходимо не менее 100 мкл цельной крови. Минимальное количество отбираемой крови, необходимое для надлежащего выполнения анализа, указано в рекомендациях производителя пробирки для забора образца.

Получите количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу в одном и том же образце цельной крови перед окрашиванием, чтобы убедиться, что количество лейкоцитов находится в пределах линейного диапазона (см. пункт «Линейность» в разделе 11 «Рабочие характеристики»).

Кровь с антикоагулянтом, хранимую при комнатной температуре (от 20 до 25 °C), необходимо окрашивать не позднее 48 часов с момента взятия и анализировать не позднее 6 часов с момента окрашивания. Если образцы были окрашены в пределах 24 часов после забора, их можно анализировать в пределах 24 часов после окрашивания.

Мешающие факторы

Не используйте ранее зафиксированные и хранившиеся образцы от пациентов. Образцы крови, охлажденные перед окрашиванием, могут давать искаженные результаты. Образцы, взятые у пациентов, получающих иммунодепрессанты, могут давать плохое разрешение.³⁸ Бластные клетки могут исказить результаты анализа. Не использовать гемолизированные образцы.

7. ПРОЦЕДУРА _____

Поставляемый реагент

- TriTEST CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP (BD кат. № 342414) или
- TriTEST CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP с пробирками TruCOUNT (BD кат. № 342445).

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект

1. Частицы CaliBRITE 3 (BD кат. № 340486).
2. FACS Lysing Solution (10-кратный), 100 мл (BD кат. № 349202). Инструкции по разбавлению и предостережения см. в инструкции-вкладыше к *FACS Lysing Solution*.
3. Чистая вода (дистиллированная или деионизированная).
4. Пробирки для забора крови VACUTAINER с EDTA-K₃ или эквивалентные.
5. Вихревая мешалка «вортекс».
6. Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD Electronic Pipette, BD кат. № 646539, или эквивалентный).

7. Дозатор масс или пипеточный дозатор для дозирования 450 мкл FACS Lysing Solution.
8. Проточная жидкость (FACSFlow™, BD кат. № 342003, или эквивалентная).
9. Контрольные образцы TruCOUNT (BD кат. № 340335).
10. Контрольный образец лизируемой цельной крови (имеющийся в продаже).

Окрашивание клеток

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

Обратное пипетирование

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

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

1. Для каждого образца пациента промаркируйте пробирку TruCOUNT идентификационным номером образца.

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

2. Внесите 20 мкл TruTEST CD4/CD8/CD3 reagent на дно пробирки TruCOUNT. Вносите реагент чуть выше металлической сеточки. Не прикасайтесь к осадку.
3. Внесите 50 мкл хорошо перемешанной, антикоагулированной цельной крови на дно пробирки.

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

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

4. Закройте пробирку и аккуратно перемешайте на вортексе. Инкубируйте 15 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
5. Добавьте в пробирку 450 мкл однократного FACS Lysing Solution.
6. Закройте пробирку и аккуратно перемешайте на вортексе. Инкубируйте 15 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C). Образец готов для анализа на проточном цитометре.

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

Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки на вортексе с малой скоростью.³⁹ При использовании FACS Loader перемешайте содержимое пробирок на вортексе непосредственно перед их размещением в подставки загрузчика. Получите и проанализируйте данные с помощью соответствующего программного обеспечения, например CellQuest software или MultiSET software. Прежде чем анализировать образцы, отрегулируйте порог для минимизации дебриса и убедитесь, что целевые популяции включены в анализ.

Контроль качества

Ежедневно выполняйте анализ контрольного образца здорового взрослого донора или коммерческого контрольного образца цельной крови для оптимизации настроек прибора и в целях контроля качества системы.³⁷

При каждом запуске для оценки производительности системы используйте коммерческие контрольные образцы с установленными уровнями процентных долей и абсолютных значений.

Визуально проверьте точечную диаграмму CD3 и SSC. Популяция Т-лимфоцитов должна отображаться в виде компактного CD3⁺ кластера с низким SSC. Не продолжайте анализ, если популяции Т-лимфоцитов рассеяны, и разделение между кластерами отсутствует или очень слабое.

На рис. 1, 2 и 3 изображены репрезентативные данные гематологически нормального образца взрослого человека, окрашенного CD4/CD8/CD3 в пробирке TruCOUNT.

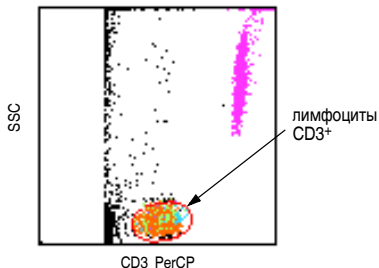


Рис. 1. Точечная диаграмма негейтированных CD3 и SSC

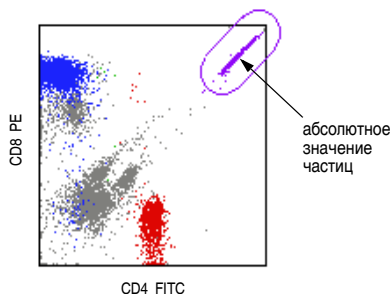


Рис. 2. Точечная диаграмма негейтированных CD4 и CD8 с гейтом частиц TruCOUNT

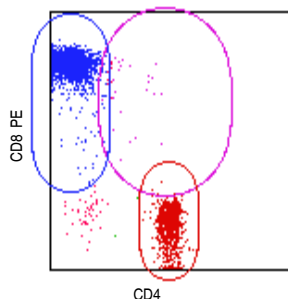


Рис. 3. Точечная диаграмма гейтированных Т-лимфоцитов CD4 и CD8

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты представлены в виде количества положительных клеток в микролитре крови (абсолютное значение).

Расчет абсолютных значений

Во время анализа абсолютное значение (клеток/мкл) положительных клеток в образце определяется путем сравнения частоты событий клеток и частиц. При использовании MultiSET software абсолютные значения рассчитываются автоматически. При анализе данных вручную с использованием CellQuest software или других программ необходимо разделить количество подсчитанных положительных клеток на количество подсчитанных частиц, а затем умножить на концентрацию частиц TruCOUNT.

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

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

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Лаборатории должны установить свои собственные диапазоны нормальных значений для параметров TriTEST CD4/CD8/CD3 reagent, на которые могут оказывать влияние пол пациента, его возраст и процедура подготовки образца. Раса, принадлежность пациента⁴⁰ и индивидуальные вариации экспрессии эпитопов⁴¹ также могут оказывать влияние, хотя в настоящее время недостаточно данных для подтверждения данного факта. Для определения нормального диапазона следует знать возраст, пол,

клиническую картину заболевания и расовую принадлежность пациентов.⁴² Указанные диапазоны нормальных значений носят только информационный характер.

2. TriTEST CD4/CD8/CD3 reagent не проверен для использования с жидкими антикоагулянтами гепарином и цитратным антикоагулянтом с декстрозой при расчете абсолютных значений с использованием пробирок TruCOUNT.
3. TriTEST CD4/CD8/CD3 reagent не предназначен для скрининга образцов на наличие лейкозных клеток или для использования с образцами для фенотипирования пациентов, больных лейкозией.
4. Абсолютные значения различны в лабораториях, использующих оборудование разных производителей.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ _____

Нормальные диапазоны

Диапазоны нормальных значений для CD4⁺, CD8⁺ и CD3⁺ Т-лимфоцитов, представленные в таблице 1, были определены в международном исследовании в лабораториях компании BD Biosciences в Сан-Хосе, штат Калифорния, а также четырех внешних центрах: Клинике Кливленда (Cleveland Clinic Foundation), Кливленд, штат Огайо; Госпитале Джона Хопкинса (Johns Hopkins Hospital), Балтимор, штат Мэриленд; Институте тропической медицины (Institute of Tropical Medicine), Антверпен, Бельгия; Госпитале при университете Северной Каролины (University of North Carolina Hospital), Чапел-Хилл, Северная Каролина. Субъектами выступали взрослые здоровые люди в возрасте от 18 до 65 лет.

Табл. 1. Репрезентативные нормальные диапазоны при исследовании крови взрослых доноров с нормальными гематологическими характеристиками

Субпопуляция	N	Среднее значение	Нижний процентиль 2,5	Верхний процентиль 97,5
Т-хелперы/Т-индукторы (клеток/мкл) ^а	523	880	410	1590
Т-супрессоры/Т-киллеры (клеток/мкл) ^а	523	490	190	1140
Общее количество Т-лимфоцитов (клеток/мкл) ^а	516	1410	690	2540

а. Абсолютные значения, округленные до ближайших 10 клеток/мкл.

Данные нормальные диапазоны являются усредненными. Для получения подробной информации о нормальных диапазонах обратитесь в службу поддержки клиентов компании BD. Более подробная информация о диапазонах нормальных значений указана в пункте 1 раздела «Ограничения».

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ _____

Рабочие характеристики реагентов были установлены в результате испытаний в лабораториях компании BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния, внешнем медицинском центре в США или Европе, или сразу в нескольких центрах.

Точность

Абсолютные значения CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов сравнивались с результатами для FACSCount.

Анализировались аликвоты одних и тех же образцов здоровых доноров и пациентов с патологией. Статистика регрессии, приведенная в таблице 2,

показывает практически эквивалентные результаты.

Табл. 2. Регрессионный анализ

Субпопуляция	N	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	R	Диапазон
Т-хелперы/Т-индукторы (клеток/мкл)	201	1,02	4 клеток/мкл	0,99	0—1880 ^a
Т-супрессоры/Т-киллеры (клеток/мкл)	196	1,00	29 клеток/мкл	0,99	70—1980 ^a
Общее количество Т-лимфоцитов (клеток/мкл)	199	1,02	8 клеток/мкл	0,99	70—2860 ^a

a. Абсолютные значения, округленные до ближайших 10 клеток/мкл.

Воспроизводимость для одного образца

Оценивалось 10 аликвот трех образцов, представляющих высокое, среднее и низкое количество CD4. Результаты представлены в табл. 3.

Табл. 3. Воспроизводимость для одного образца для TriTEST CD4/CD8/CD3 reagent

Субпопуляция	Уровень	Среднее значение	SD	CV (%)
Т-хелперы/Т-индукторы (клеток/мкл)	Высокий	2048	86	4,2
	Средний	1311	37	2,9
	Низкий	355	10	2,7
Т-супрессоры/Т-киллеры (клеток/мкл)	Высокий	729	25	3,5
	Средний	483	19	3,9
	Низкий	334	12	3,7
Общее количество Т-лимфоцитов (клеток/мкл)	Высокий	2770	100	3,6
	Средний	1869	52	2,8
	Низкий	711	18	2,6

Стабильность

Было проведено исследование стабильности рабочих характеристик реагента TriTEST во времени относительно спецификаций. В процессе исследования измерялись: 1) изменения, связанные с хранением цельной крови перед окрашиванием, 2) изменения по прошествии времени между окрашиванием и сбором данных, 3) совмещение этих двух эффектов.

Основываясь на результатах этого исследования,* мы рекомендуем выполнять окрашивание образцов в пределах 48 часов после забора и анализировать образцы в пределах 6 часов после окрашивания; или окрашивать образцы в пределах 24 часов после забора и анализировать их в пределах 24 часов после окрашивания.

* Данные доступны в BD Biosciences.

Перекрестная реактивность

Антитела CD4 реагируют с моноцитами, а также с Т-хелперами/Т-индукторами.¹⁸ Антитела CD8 реагируют с NK-лимфоцитами⁴³, а также с Т-супрессорами/Т-киллерами.

Линейность

Линейность оценивалась в диапазоне концентраций лейкоцитов от $2,5 \times 10^3$ до $31,0 \times 10^3$ клеток/мкл и концентраций лимфоцитов от $2,0 \times 10^2$ до $16,7 \times 10^3$ лимфоцитов/мкл. Линейность полученных результатов наблюдалась в пределах диапазонов: CD3⁺CD4⁺ (от 68 до $7,2 \times 10^3$ клеток/мкл), CD3⁺CD8⁺ (от 43 до $3,9 \times 10^3$ клеток/мкл) и CD3⁺ (от 124 до $1,1 \times 10^4$ клеток/мкл).

ГАРАНТИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
2. Nicholson JKA. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch Pathol Lab Med*. 1989;113:598-605.
3. Foucar K, Goeken JA. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Med*. 1982;13:403-413.
4. Cohen SB, Weetman AP. Activated interstitial and intraepithelial thyroid lymphocytes in autoimmune thyroid disease. *Acta Endocrinol*. 1988;119:161-166.

5. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
6. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:55-61.
7. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS*. 1990;4:479-497.
8. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8⁺ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol*. 1986;137:3436-3439.
9. Gratama JW, Naipal A, Olijans 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.
10. Bishop GA, Hall BM, Duggin GG, Horvath JS, Sheil AGR, Tiller DJ. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Internat*. 1986;29:708-717.
11. Wolde-Mariam W, Peter JB. Recent diagnostic advances in cellular immunology. *Diag Med*. 1984;7:25-32.
12. Centers for Disease Control. 1997 Revised guidelines for performing CD4⁺ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*. 1997;46(No. RR-2):1-29.
13. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. CD4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. *Cytometry*. 1993;14:685-689.
14. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry*. 1996;26:227-230.
15. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry*. 1996;26:16-21.
16. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to the T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.

17. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leukocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
18. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol*. 1983;131:212-216.
19. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
20. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti-Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
21. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:259-288.
22. Organizing Committee of the Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. Appendix A: CD guide. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press Inc; 1989:1074-1093.
23. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312:763-767.
24. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986;47:333-348.
25. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Monoclonal antibodies to the CD4 and CD8 antigens precipitate variable amounts of CD4/CD8-associated p56^{lck} activity. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
26. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
27. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1989;86:10044-10048.
28. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman SF. Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *J Immunol*. 1987;139:678-682.
29. Eichmann K, Jönsson J-I, Falk I, Emmrich F. Effective activation of resting mouse T lymphocytes by cross-linking submitogenic concentrations of the T cell antigen receptor with either Lyt-2 or L3T4. *Eur J Immunol*. 1987;17:643-650.
30. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
31. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP, et al. Identification of a putative second T cell receptor. *Nature*. 1986;322:145-149.
32. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-662.
33. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
34. *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue: Tentative Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.
35. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993;160:215-218.
36. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document H3-A3.
37. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes; Tentative Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992. NCCLS document H42-T.
38. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
39. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.

40. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 1985;3(1):33-37.
41. Angadi CV. Lack of Leu-3a epitope on T-helper (CD4) lymphocytes. *J Clin Lab Anal*. 1990;4:193-195.
42. *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992. NCCLS document C28-A.
43. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol*. 1983;131:1789-1796.