



Simultest CD3/CD19 Reagent

50 тестов на флакон — кат. № 342404

Для определения Т- и В-клеток
в периферической крови человека

6/2010

23-13709-01



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



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
San Jose, CA 95131
Тел.: 877-232-8995
Факс: 408-954-2347
ClinicalApplications@bd.com



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

BD Biosciences
Поддержка клиентов в Европе
Тел.: 322-400-9895
Факс: 322-401-7094
help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

BD Simultest™ CD3/CD19 представляет собой набор реагентов для определения процентных долей зрелых Т- и В-лимфоцитов в лизированной цельной крови человека методом прямой двухцветной иммунофлуоресценции.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Лимфоциты человека можно разделить на три большие популяции согласно их биологической функции и экспрессии поверхностного антигена: Т-лимфоциты, В-лимфоциты и естественные киллеры (NK-лимфоциты). Т-лимфоциты принимают участие в антиген-специфическом клеточно-опосредованном иммунном ответе и регулируют секрецию иммуноглобулина В-лимфоцитами. Т-лимфоциты подразделяются, в зависимости от их функциональных свойств, на Т-хелперы/Т-индукторы и Т-супрессоры/Т-киллеры.

Клиническое применение*

Общие значения процентных долей Т-лимфоцитов (CD3⁺) и В-лимфоцитов (CD19⁺) используются для описания и мониторинга некоторых форм иммунодефицита^{1, 2} и аутоиммунных заболеваний.^{3—5}

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

При добавлении реагентов на основе моноклональных антител к цельной

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

крови человека происходит специфическое связывание меченых флуорохромом антител с поверхностными антигенами лейкоцитов. Моноклональные антитела можно использовать для определения субпопуляций лимфоцитов.

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

4. РЕАГЕНТ

Реагента в комплекте достаточно для проведения 50 анализов

Реагент Simultest CD3/CD19 reagent, количества которого достаточно для выполнения 50 анализов, поставляется в 1 мл буферного солевого раствора, содержащего желатин и 0,1 % азида натрия. Реагент содержит меченые флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) антитела к CD3, клон SK7,^{6—9} для идентификации Т-лимфоцитов и меченые фикоэтрином* (PE) антитела к CD19, клон 4G7,¹⁰ для идентификации В-лимфоцитов. Соотношение флуоресцеин/белок (F:P) для реагентов BD на основе моноклональных антител IgG составляет от 2 до 5. Соотношение F:P для CD3 FITC оптимизировано в соответствии с его назначением.

Антитело CD3 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁.

CD3 вступает в реакцию с эпсилон-цепью комплекса рецепторов антигена CD3/антигена Т-клетки (ТкР).¹¹ Этот комплекс состоит из не менее чем шести белков с молекулярной массой от 20 до 30 килодалтон (кДа).¹² Антиген, распознаваемый антителами к CD3, нековалентно связан с ТкР α/β или γ/δ (от 70 до 90 кДа).¹³

Антитело CD19 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁. Антиген, распознаваемый антителами к CD19, присутствует на В-лимфоцитах человека на всех этапах их созревания, но отсутствует на плазматических клетках. Антиген CD19 может участвовать в активации и пролиферации В-лимфоцитов.¹⁴ Молекулярная масса антигена, распознаваемого этим антителом, составляет 90 кДа.¹⁴

Меры предосторожности

1. Для диагностики *in vitro*.
2. Хранение при температуре от 2 до 8 °C обеспечивает стабильность реагента на основе антител до даты истечения срока годности, которая указана на этикетке. После истечения срока годности не использовать.
3. Реагент на основе антител нельзя замораживать или подвергать прямому воздействию света при хранении или инкубации с клетками. Не подвергайте флакон с реагентом воздействию влаги.

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

4. Изменение внешнего вида реагента, например, выпадение осадка или обесцвечивание, свидетельствует о нестабильности или порче. В таких случаях не следует использовать реагент.
5. Реагент на основе антител в качестве консерванта содержит азид натрия, однако следует принимать меры предосторожности во избежание микробного загрязнения, которое может приводить к получению неверных результатов.

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

6. **ОСТОРОЖНО!** Все образцы, взятые у пациентов, и контактирующие с ними материалы подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования и требуют

утилизации с соблюдением надлежащих мер предосторожности в соответствии с федеральными, региональными и местными нормативами. Не выполнять пипетирование ртом. Не допускать контакта образцов с кожей и слизистыми оболочками.

5. ПРИБОР

Simultest CD3/CD19 reagent предназначен для использования с проточным цитометром BD FACSTM, оснащенным соответствующим аппаратным и программным обеспечением компьютера, а также электронной системой гейтирования. Проточный цитометр должен быть оснащен компонентами, необходимыми для детектирования двухцветной флуоресценции, прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Компания BD рекомендует использовать для сбора и анализа данных программное обеспечение SimulSET™ версии 2.5 или более поздней.

Все рабочие характеристики были получены с использованием проточного цитометра BD FACScan™ и проверены с использованием проточного цитометра FACStrak™. Другие системы могут иметь другие характеристики и должны быть проверены пользователем.

Для получения информации относительно использования данного реагента в исследовательских целях с применением других приборов FACS обратитесь в центр поддержки клиентов компании Becton Dickinson.

6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Отберите кровь посредством венепункции^{15, 16} с соблюдением правил асептики в стерильную вакуумную пробирку VACUTAINER® с EDTA-K₃ (этилендиаминтетрауксусной кислотой) (фиолетовая крышка). Для анализа необходимо не менее 1 мл цельной крови. Для получения оптимальных результатов необходимо выполнять окрашивание образцов крови не позднее, чем через 6 часов после венепункции. Кровь с антикоагулянтом можно хранить перед окрашиванием не дольше 6 часов при комнатной температуре (от 20 до 25 °C). Охлаждение образцов крови перед окрашиванием может приводить к получению искаженных результатов.

Следует определить количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу в одном и том же образце цельной крови перед окрашиванием. Диапазон приемлемых концентраций лейкоцитов составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,4 \times 10^3$ клеток/мкл. Если результат подсчета превышает $9,4 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл, необходимо разбавить образец однократным фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1 % азида натрия. Для анализа образцов с результатом подсчета ниже $3,5 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл может потребоваться большее количество крови, а также выполнение процедуры разделения для повышения концентрации клеток.

Мешающие факторы

Не следует использовать ранее зафиксированные и хранившиеся образцы. Охлаждение образцов цельной крови перед окрашиванием может приводить к получению искаженных результатов. Для получения оптимальных результатов необходимо выполнять окрашивание образцов крови не позднее, чем через 6 часов после венепункции. Образцы, полученные от пациентов, принимающих иммунодепрессанты, могут давать плохое разрешение.¹⁷ Наличие бластных клеток, незлированных или содержащих ядра эритроцитов может влиять на результаты анализа. Не использовать гемолизированные образцы. Соблюдайте инструкции производителя пробирки для отбора крови в отношении минимального объема крови.

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

7. ПРОЦЕДУРА

Поставляемый реагент

См. пункты «Комплект поставки реагента» и «Меры предосторожности» в разделе 4 «Реагент».

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект

1. Реагент Simultest LeucoGATE™ (CD45/CD14), 1 мл, (BD кат. № 342408). Информацию относительно определения гейта анализа лимфоцитов см. в инструкции-вкладыше к реагенту *Simultest LeucoGATE* и в *Руководстве пользователя программного обеспечения SimulSET*. Хранить при температуре от 2 до 8 °C.
2. Контроль Simultest control γ_1/γ_{2a} (IgG₁ FITC/IgG_{2a} PE) (оба избирательно реагируют с гемоцианином фиссуреллы), 1 мл (BD кат. № 342409). Хранить при температуре от 2 до 8 °C.
3. Лизирующий раствор FACS Lysing Solution* (10-кратный) (BD кат. № 349202). Инструкции по разбавлению и предупреждения см. на вкладыше к продукту.
4. Частицы CaliBRITE™ Beads (BD кат. № 349502). Подробная информация по использованию приведена в инструкции-вкладыше упаковки *CaliBRITE Beads*.
5. Пробирки для забора крови VACUTAINER с EDTA-K₃ или эквивалентные.
6. Одноразовые полистироловые пробирки Falcon™ с крышками 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные.
7. Вихревая мешалка «вортекс».
8. Низкоскоростная центрифуга (минимальная скорость 200 x g) с горизонтальным ротором и вставками для пробирок 12 x 75 мм.
9. Вакуумный аспиратор с ловушкой.
10. Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD, BD кат. № 646539, или эквивалентная).
11. Фосфатно-солевой буфер (PBS), однократный (модифицированный раствор Дюльбекко, pH $7,2 \pm 0,2$; 0,01 моль/л PO₄; и 0,15 моль/л NaCl).¹⁸ Этот реагент не содержит кальция, магния, фенолового красного или азида натрия. Перед использованием PBS необходимо отфильтровать через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Хранить при температуре от 2 до 8 °C.
12. PBS, в соответствии с параграфом 11 выше, с 0,1 % азида натрия.
13. Проточная жидкость.
14. Параформальдегид (1 %) для фиксации клеток. Растворите 1 г параформальдегида в 100 мл свежеприготовленного PBS, осторожно нагревая смесь при

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

температуре не выше 56 °С в вытяжном шкафу. Доведите pH до $7,4 \pm 0,2$ с помощью NaOH (0,1 моль/л) или HCl (0,1 моль/л). Отфильтруйте через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Хранить в стеклянной таре при температуре от 2 до 8 °С.

ОСТОРОЖНО! Формальдегид представляет опасность при вдыхании, контакте с кожей и при попадании внутрь (R20/21/22). Он обладает раздражающим действием на глаза и кожу (R36/38). При продолжительном воздействии возможно развитие злокачественных новообразований. Возможный риск необратимых эффектов (R68). Может вызывать сенсибилизацию при контакте с кожей (R43). Хранить в закрытом, недоступном для детей месте (S1/2). Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки (S36/37). При попадании внутрь немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите упаковку или этикетку (S46). Утилизировать согласно федеральным, государственным и местным постановлениям.

15. Чистая вода (дистиллированная или деионизированная).

Окрашивание и фиксация клеток

Образцы цельной крови вначале окрашиваются реагентами Simultest LeucoGATE (пробирка А), Simultest control (пробирка В) и Simultest CD3/CD19 reagent* (пробирка С). После окрашивания образцы обрабатываются разбавленным

(однократным) FACS Lysing Solution для лизиса эритроцитов. Защищайте пробирки от попадания прямого света. Выполнять процедуру следует при комнатной температуре (от 20 до 25 °С), используя реагенты с такой же температурой. См. пункт «Меры предосторожности» раздела 4 «Реагент».

1. Промаркируйте по три пробирки 12 x 75 мм для каждого образца пациента (А, В и С). На каждой пробирке также укажите идентификационный номер образца.
2. Внесите в пробирку А 20 мкл Simultest CD3/CD19 reagent, в пробирку В — 20 мкл Simultest control, в пробирку С — 20 мкл Simultest CD3/CD19 reagent.
3. Используя для каждой пробирки новый наконечник дозатора, аккуратно добавьте на дно каждой из трех промаркированных пробирок по 100 мкл хорошо перемешанной цельной крови с антикоагулянтом. Рекомендуемая концентрация лейкоцитов составляет от $3,5 \times 10^3$ до $9,4 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл. Тщательно перемешайте содержимое пробирок, встряхивая их в течение 3 секунд на вортексе с низкой скоростью, и инкубируйте 15—30 минут при комнатной температуре (от 20 до 25 °С).

ПРИМЕЧАНИЕ. В ходе инкубации образцы необходимо защищать от

* Комбинация и методика применения реагентов Simultest LeucoGATE, Simultest control γ_1/γ_{2a} и Simultest CD3/CD19 reagent защищена патентами США №№ 4 987 086 и 5 064 616.

прямого воздействия света, а также принять меры для предотвращения стекания крови по стенке пробирки. Если цельная кровь останется на стенке пробирки, она не окрасится реагентом.

4. Добавьте в каждую пробирку по 2 мл однократного FACS Lysing Solution комнатной температуры (от 20 до 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 (от 20 до 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.

5. Сразу после инкубации центрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 300 x g и комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
6. Аспирируйте 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 x g и комнатной температуре (от 20 до 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 от 2 до 8 °C до анализа в проточном цитометре. Анализ фиксированных клеток необходимо выполнить не позднее чем через 24 часа после окрашивания. Для уменьшения агрегации, прежде чем вводить клетки в проточный цитометр, тщательно перемешайте их на вортексе на малой скорости.¹⁸

Проточная цитометрия

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

Контроль качества

Для получения оптимальных результатов компания BD рекомендует перед использованием Simultest CD3/CD19 reagent для выполнения анализа в проточном цитометре FACScan или FACStrak установить напряжения фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), настроить компенсацию флуоресценции и проверить чувствительность прибора с помощью CaliBRITE Beads и программного обеспечения AutoCOMP™.

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

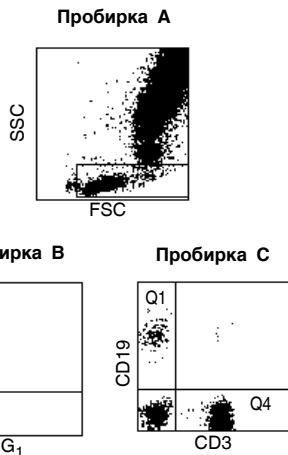


Рис. 1. Результат анализа образцов лизированной цельной крови пациента с нормальными гематологическими характеристиками, окрашенных реагентами Simultest LeucoGATE (пробирка А), Simultest control (пробирка В) и Simultest CD3/CD19 reagent (пробирка С). Simultest LeucoGATE, который использовался для уменьшения влияния дебриса, моноцитов и гранулоцитов в гейте, показанном для пробирки А. Точечные графики FL1 (ось x) относительно FL2 (ось y) представлены для пробирок В и С

а также для выявления неспецифического окрашивания, которое указывает на недостоверность результатов анализа образцов пациента.

Контроль Simultest control анализируется с каждым образцом пациента с целью установки маркеров флуоресценции 1 (FL1) и 2 (FL2) между кластерами отрицательных и положительных результатов окрашивания лимфоцитов,

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

Программа SimulSET автоматически проанализирует данные и отобразит соответствующее количество предупреждающих сообщений об ошибках. Список возможных сообщений приведен в *Руководстве пользователя программного обеспечения SimulSET*. С целью оценки качества полученных данных программа будет использовать следующие критерии при анализе точечных графиков для каждого образца.

1. Оператор должен отклонить 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 10%)» (чрезмерная контаминация эритроцитами/ядросодержащими эритроцитами и дебрисом, более 10 %); «excessive monocyte (greater than 3 %)» (чрезмерная контаминация моноцитами, более 3 %) или «granulocyte (greater than 6 %) contamination of the lymphocyte gate»

(чрезмерная контаминация гейта лимфоцитов гранулоцитами, более 6 %).

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

4. Различия в количестве гейтированных событий между пробирками должно быть меньше или равно 500 для всех пробирок панели, за исключением пробирки с реагентом Simultest LeucoGATE (A). (Однако, если есть отклонения в контрольной пробирке с Simultest control, результаты анализа панели сомнительны.)

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Пересчет процентной доли лимфоцитов

Если выполняется пересчет процентной доли лимфоцитов, субпопуляция CD3⁺ и субпопуляция CD19⁺ лимфоцитов выражаются как процентные доли лимфоцитов в гейте анализа. Если пересчет не выполняется, результаты представляются как процентная доля гейтированных событий.

Дифференциальный подсчет трех фракций

В лизированной цельной крови с помощью реагента Simultest LeucoGATE (пробирка A) можно определять процентную долю моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов в общем количестве лейкоцитов. Программа SimulSET автоматически выполняет дифференциальный подсчет трех фракций. Примеры распечатки данных приведены в *Руководстве пользователя программного обеспечения SimulSET*.

ПРИМЕЧАНИЕ. Получаемые программой SimulSET результаты дифференциального подсчета следует использовать

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

Абсолютные количества

Абсолютное количество клеток можно рассчитать, если значения лейкоцитов и процентной доли лимфоцитов получены из результатов дифференциального подсчета лейкоцитов с помощью стандартного лабораторного метода. Инструкции по выполнению подсчета абсолютных количеств приведены в *Руководстве пользователя программного обеспечения SimulSET*.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Лаборатории должны установить свои собственные диапазоны нормальных значений для параметров Simultest CD3/CD19 reagent, на которые могут оказывать влияние пол пациента, его возраст и процедура подготовки образца. Расовая принадлежность пациента также может оказывать влияние, хотя в настоящее время недостаточно данных для подтверждения данного факта. Возраст, пол, клиническое состояние и расовая принадлежность пациентов должны быть учтены при определении диапазона нормальных значений.

- Результаты, полученные с помощью Simultest CD3/CD19 reagent, должны использоваться в комплексе с другой информацией, полученной при клиническом обследовании и дополнительных независимых диагностических процедурах.
- Simultest CD3/CD19 reagent не предназначен для скрининга образцов на наличие лейкозных клеток или для использования с образцами для фенотипирования пациентов, больных лейкемией. Присутствие бластных клеток может помешать правильно установить гейт анализа лимфоцитов с помощью Simultest LeucoGATE. Программа отметит такой образец флагом и не будет печатать его результаты.
- Значения абсолютных количеств субпопуляций лимфоцитов в разных лабораториях могут отличаться вследствие применения различных методов определения количеств лейкоцитов и/или лейкоцитарной формулы.

10.ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Субпопуляции лейкоцитов

Процентная доля популяции В-лимфоцитов, представленная в квадранте 1 (Q1), и Т-лимфоцитов, представленная в квадранте 4 (Q4), для пробирки С показаны на рис. 1 и в *Руководстве пользователя программного обеспечения SimulSET*. Клинически значимые результаты приводятся в отчете лечащего врача.

Компания BD установила диапазоны нормальных значений для параметров, определяемых Simultest CD3/CD19 reagent, исследовав с помощью проточного цитометра FACScan 160 образцов здоровых доноров мужского и женского пола в шести медицинских учреждениях (пять медицинских центров в Европе и один в США). Ожидаемые диапазоны нормальных значений для Т- и В-лимфоцитов лизированной целной крови представлены в таблице 1.¹⁹

Табл.1. Репрезентативные нормальные диапазоны
Параметры, определяемые Simultest CD3/CD19 reagent в крови взрослых доноров с нормальными гематологическими характеристиками, как общая процентная доля гейтированных лимфоцитов (в пересчете).

Обобщенные данные из трех медицинских центров

Параметр	Пол	Воз-раст	n	Сред-нее значение	95 % диа-пазон*
Общее количество Т-лимфоцитов	Оба	18—70	160	72	59—85
Общее количество В-лимфоцитов	Оба	18—70	160	13,0	6,4—23

Нормальные диапазоны для взрослых неприменимы для детей.

При определении диапазонов нормальных значений возможно следует учитывать расовую принадлежность,²⁰ однако компания BD не имеет для этого достаточных данных.

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.

11. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики Simultest CD3/CD19 reagent определялись путем проведения испытаний в одном медицинском центре США и/или лабораториях компании BD в Сан-Хосе, штат Калифорния.

Воспроизводимость результатов в рамках образца

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

Воспроизводимость результатов между приборами

В таблице 3 представлены данные воспроизводимости результатов между приборами.

Табл.2. Воспроизводимость результатов в рамках образца для параметров, определяемых Simultest CD3/CD19 reagent (шесть здоровых и четыре больных доноров); процентные доли лимфоцитов (в пересчете)

Доноры	Параметр	Среднее значение	SD В пределах одного окрашивания	df	SD Между окрашиваниями	df
Норма	Общее количество Т-лимфоцитов	72,7	0,845	12	0,858	15,6
	Общее количество В-лимфоцитов	13,5	0,816	12	0,816	18,0
Патология	Общее количество Т-лимфоцитов	82,9	0,766	8	0,927	8,1
	Общее количество В-лимфоцитов	8,81	0,559	8	0,662	8,4

Табл.3. Воспроизводимость результатов между приборами для параметров, определяемых Simultest CD3/CD19 reagent (пять здоровых донора и два прибора); процентные доли лимфоцитов (в пересчете)

Параметр	Прибор	Среднее значение	SD	CV
Общее количество Т-лимфоцитов	1	68,2	0,77	1,13
	2	68,7	0,71	1,04
Общее количество В-лимфоцитов	1	17,2	0,80	4,66
	2	17,8	0,88	4,97

Воспроизводимость результатов между лабораториями

О воспроизводимости результатов между лабораториями свидетельствует возможность объединения нормальных диапазонов параметров, определяемых с помощью Simultest CD3/CD19 reagent (таблица 1).

Сравнение Simultest CD3/CD19 reagent с другим методом

В таблице 4 представлены обобщенные результаты.

Табл.4. Сравнение Simultest CD3/CD19 reagent с другим методом^а
(панель реагентов Simultest IMK Plus и IMK-Lymphocyte)

Пара-метр	Нак-лон	Точка пересечения с осью ординат	R	n	Диапазон данных (%)	
					IMK Plus	IMK-L ym-p ho-c yte
Общее коли-че ство Т-лим-ф оцитов	0,94	3,66	0,96	85	50—97	47—96
Общее коли-че ство В-лим-ф оцитов	0,98	0,62	0,97	85	1—25	1—29

а. Данные были получены с помощью реагентов Simultest IMK-Lymphocyte, в которые входят LeucoGATE, control γ_1/γ_{2a} и CD3/CD19. Использовалась программа Simultest IMK-Lymphocyte.

Стабильность окрашенных клеточных образцов

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

Перекрестная реактивность

CD3 и CD19 не обладают известной перекрестной реактивностью с лимфоцитарными элементами крови.

Линейность и выход

Линейность результатов ожидается в диапазоне от $3,5 \times 10^3$ до $9,4 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл.

ГАРАНТИЯ

Для продаваемых согласно данным условиям продуктов гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке или маркировке продукта 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

- Schmidt R. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut.* 1989;59:200–206.
- 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.
- Foucar K, Goeken J. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Med.* 1982;13:403-413.

4. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol.* 1986;137:3436-3439.
5. 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.
6. Haynes B. Summary of T cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
7. 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.
8. 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.
9. Knowles R. Immunochemical analysis of the T cell-specific antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
10. Nadler L. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and comments. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-43.
11. 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.
12. Brenner M, Groh V, Porcelli A, et al. Plenary papers: Structure and distribution of the human T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
13. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor-CD3 complex: A dynamic protein ensemble. *Annual Rev Immunol.* 1988;(6):629.
14. Dörken B, Moller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Molderhsuer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
15. A National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the *Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3-A3)*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes; Tentative Guideline (H42-T)*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992.
17. Giorgi J. Lymphocyte subset measurements: Significance in clinical medicine. In: Rose N, Friedman H, Fahey J, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
18. Jackson A, Warner N. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose N, Friedman H, Fahey J, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
19. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991;60:190-208.
20. Prince H, Hirji K, Waldbeser L, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier L. Influence of racial background on the distribution of T cell subsets and Leu-11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diag Immunol.* 1985;3:33-37.