



TriTest CD3 FITC/ CD16 + CD56 PE/ CD45 PerCP Reagent

50 тестов на флакон — кат. № 342411

50 тестов на флакон с пробирками TruCOUNT —
кат. № 342442

Для определения процентных долей и абсолютных количеств Т-лимфоцитов и естественных киллеров (NK-лимфоцитов) человека в цельной крови с лизированными эритроцитами.

6/2010

23-13680-01



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™ CD3 флуоресцеин изотиоцианат (FITC)/CD16 + CD56 фикоэритрин* (PE)/CD45 перидинин-хлорофилл протеин† (PerCP) представляет собой реагент для прямой трехцветной иммунофлуоресценции, предназначенный для использования с надлежащим образом оснащенный проточным цитометром с целью идентификации и определения процентных долей, а также абсолютных количеств следующих субпопуляций зрелых лимфоцитов человека в цельной крови с лизированными эритроцитами: зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) и естественных киллеров (NK-лимфоцитов) (CD3-CD16⁺CD56⁺). При использовании с пробирками TruCOUNT™ подсчет абсолютных количеств этих субпопуляций можно выполнить в одной пробирке.

Реагент BD TriTEST и пробирки TruCOUNT могут использоваться с FACS Loader. Этот реагент можно использовать как с контролем изотипа, так и без него.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Лимфоциты человека можно разделить на три основные популяции в зависимости от их биологической функции и экспрессии антигена клеточной поверхности: Т-лимфоциты, В-лимфоциты и естественные киллеры (NK-лимфоциты).

Клиническое применение

Было показано, что NK-лимфоциты, идентифицированные как CD3⁻ и CD16⁺ и/или CD56⁺, опосредуют цитотоксичность в отношении определенных опухолей и клеток, инфицированных вирусами.¹ NK-опосредованная цитотоксичность не

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

† Патент США № 4 876 190.

требует присутствия в клетке-мишени молекул белков главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I или II.²

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

При добавлении цельной крови к реагенту содержащиеся в нем меченные флуорохромом антитела специфично связываются с поверхностными антигенами 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, внутренней сложности и относительной интенсивности флуоресценции. Реагенты Tritest активируют флуоресценцию, делая возможным гейтирование популяции лимфоцитов для прямой флуоресценции^{3—5} с целью снижения количества проникновений незализованных или ядродержащих эритроцитов в гейт.

При использовании пробирок TruCOUNT определенный объем образца окрашивается непосредственно в пробирке TruCOUNT. Лиофилизированный осадок в пробирке растворяется, высвобождая определенное число флуоресцентных частиц. Во время анализа абсолютное количество (клеток/мкл) положительных клеток в образце определяется путем сравнения частоты встречаемости клеток и частиц. При использовании соответствующего программного обеспечения, например MultiSET™, абсолютные количества рассчитываются программой. При анализе данных вручную с использованием такого программного обеспечения, как CellQuest™, необходимо разделить количество подсчитанных

положительных клеток на количество подсчитанных частиц, а затем умножить на концентрацию частиц TruCOUNT.

4. РЕАГЕНТ

В комплекте реагент, достаточный для проведения 50 анализов

Реагент BD Tritest CD3/CD16 + CD56/CD45 reagent поставляется в буферном солевом растворе с 0,1 % азида натрия в объеме 1 мл. Он содержит меченые FITC антитела к CD3, клон SK7,^{6—8} меченые PE антитела к CD16, клон B73.1,^{9—11} и к CD56, клон NCAM 16.2,¹² а также меченные PerCP антитела к CD45, клон 2D1 (HLE-1).¹³

Антитело к CD3 выявляет Т-лимфоциты и распознает эпсилон-цепь комплекса рецептора антигена CD3/Т-клеточного антигена (ТкР).¹⁴ Этот комплекс состоит из не менее чем шести белков с молекулярной массой от 20 до 30 килодальтон (кДа).¹⁵ Антиген, распознаваемый антителами к CD3, нековалентно связан с α/β или γ/δ субъединицами ТкР (от 70 до 90 кДа).¹⁶

CD16 и CD56 вместе способствуют выявлению популяции НК-лимфоцитов.^{1, 4} CD16 распознает антиген человеческих НК-лимфоцитов молекулярной массой 50—70 кДа, который является Fc-рецептором к IgG.^{9, 10, 17} Реакция CD16 с гранулоцитами вариабельна.¹⁰ CD56 распознает внеклеточный иммуноглобулин-подобный домен, типичный для форм с тремя молекулярными массами (120, 140 и 180 кДа) молекулы адгезии нервных клеток (NCAM).^{18—20}

CD45 распознает антиген человеческих лейкоцитов молекулярной массой от 180 до 220 кДа, относящийся к семейству общих лейкоцитарных антигенов (LCA).²¹

Антитела CD3, CD16 и CD45 состоят из тяжелых цепей γ_1 и легких каппа-цепей мышиного иммуноглобулина. Антитело CD56 состоит из тяжелых цепей γ_{2b} и легких каппа-цепей мышиного иммуноглобулина.

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. Хотя реагент с антителами содержит в качестве консерванта азид натрия, 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^{22, 23} 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.²⁴
5. Необходим лизирующий раствор FACSTM Lysing Solution*, содержащий диэтиленгликоль и формальдегид. Предупреждения см. в инструкции-вкладыше упаковки *FACS Lysing Solution*.
6. Для получения правильных результатов при использовании пробирок TruCOUNT критически важным является внесение точного объема крови. Откалибруйте пипетки, чтобы добавлять ровно 50 мкл образца. Компания BD предлагает электронные пипетки, работающие в режиме обратного пипетирования (см. № 7 в п. «Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект»). Если эта или аналогичные пипетки не применяются, используйте технику обратного пипетирования (см. краткое описание в п. «Обратное пипетирование» в разделе 7). Для получения дополнительной информации см. инструкцию производителя пипетки.
7. Содержание частиц в пробирках TruCOUNT разное для каждой партии.

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

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 промывки. Для сбора данных не пытайтесь преодолеть порог прямого светорассеяния (FSC).

Хранение и обращение

1. Хранить реагент при температуре 2—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. Пробирка с реагентом должна оставаться сухой.
3. Пробирки TruCOUNT следует хранить в оригинальном пакете из полимерной пленки при температуре 2—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. Используйте 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 CD3/CD16 + CD56/CD45 reagent и пробирки TruCOUNT предназначены для использования с проточным цитометром, оборудованном соответствующими техническими средствами и программным обеспечением. Компания BD рекомендует проточные цитометры FACSCalibur™, FACSsort™ или FACScan™, однако можно использовать и другие платформы. Цитометр должен быть оснащен лазером 488 нм и быть способен определять рассеяние света (прямое и боковое) и трехцветную флуоресценцию с излучением, обнаруживаемым в трех диапазонах: 515—545 нм, 562—607 нм и > 650 нм. Прибор должен обладать возможностью установки порогового уровня или дискриминации с использованием канала > 650 нм. С данным прибором можно также использовать BD FACS Loader.

Компания BD рекомендует использовать частицы CaliBRITE™ Beads и программное обеспечение FACSComp™ 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 (не BD) следует обратиться к инструкции производителя по настройке трехцветного иммунофенотипирования.

Компанией BD разработано программное обеспечение, такое как MultiSET, 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^{25, 26} в стерильную вакуумную пробирку VACUTAINER® с EDTA-K₃ (этилендиаминтетраацетатом) (с крышечкой бледно-лилового цвета). TriTEST CD3/CD16 + CD56/CD45 reagent и пробирки TruCOUNT проверены как с жидкой, так и с сухой формой EDTA-K₃. Для анализа необходимо не менее 100 мкл цельной крови. Соблюдайте инструкции производителя пробирки для взятия крови в отношении минимального объема крови, который необходимо взять, чтобы обеспечить нужное разбавление образца, особенно при определении абсолютного количества с использованием частиц TruCOUNT.

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») или чтобы посчитать абсолютные значения по процентным долям.

Антикоагулированную кровь, хранимую при комнатной температуре (20—25 °C), необходимо окрашивать не позднее 6 часов с момента взятия и анализировать не позднее 6 часов с момента окрашивания.

Мешающие факторы

Не используйте ранее зафиксированные и хранившиеся образцы пациентов. Образцы

крови, охлажденные перед окрашиванием, могут давать искаженные результаты. Образцы, взятые у пациентов, получающих иммунодепрессанты, могут давать плохое разрешение.²⁷ Бластные клетки могут искажать результаты анализа. Следует отказаться от использования гемолизированных образцов.

7. ПРОЦЕДУРА

Поставляемый реагент

- TriTEST CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PerCP (BD кат. № 342411) или
- TriTEST CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PerCP с пробирками TruCOUNT (BD кат. № 342442).

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 сбора крови VACUTAINER с EDTA-K₃ или эквивалентные.
5. Одноразовые полистироловые пробирки Falcon™ с крышками 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные (если не используются пробирки TruCOUNT).
6. Вихревая мешалка «вортекс».
7. Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD, BD кат. № 646539, или эквивалентный).

8. Дозатор масс или пипеточный дозатор для дозирования 450 мкл FACS Lysing Solution.
9. Проточная жидкость (FACSFlow™, BD кат. № 342003, или эквивалентная).
10. Контрольные образцы TruCOUNT (BD кат. № 340335), необходимы при использовании пробирок TruCOUNT.
11. Лизируемый образец цельной крови (коммерчески доступный).

Окрашивание клеток

Для оценки количества антиген-неспецифического связывания антител реагенты TriTEST можно использовать как с контролем изотипа, так и без него. Если планируется использовать контроль, компания BD предлагает реагент для контроля изотипа IgG₁/IgG₁/CD45 BD кат. № 342415.

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

Обратное пипетирование

Для получения правильных результатов при использовании пробирок TruCOUNT 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.

Окрашивание

1. Для каждого образца пометьте пробирку 12 x 75 мм идентификационным номером образца.

Для абсолютных величин вместо пробирки 12 x 75 мм пометьте пробирку TruCOUNT.

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 TriTEST CD3/CD16 + CD56/CD45 reagent на дно каждой пробирки.

При использовании пробирок TruCOUNT, вносите реагент чуть выше сеточки из нержавеющей стали. Не прикасайтесь к осадку.

3. Внесите 50 мкл хорошо перемешанной цельной крови с антикоагулянтом 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 внесения 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 (20—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 (20—25 °C). Образец готов для анализа на проточном цитометре.

Проточная цитометрия

Если образцы не будут проанализированы сразу после подготовки, их следует хранить в темноте при комнатной температуре.

Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки на вортексе на малой скорости.²⁸ 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 или MultiSET. 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.²⁶ Дополнительно с помощью реагента контроля изотипа TriTEST можно установить флуоресцентные маркеры с целью обнаружения неспецифического окрашивания.

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

Визуально проверьте точечную диаграмму CD45 и SSC. Популяция лимфоцитов должна отображаться в виде яркого, компактного кластера с низким SSC. Моноциты и гранулоциты также должны отображаться в виде отчетливых кластеров. Не продолжайте анализ, если популяции рассеяны и разделение между кластерами отсутствует или очень слабое.

На рис. 1, 2 и 3 изображены репрезентативные данные гематологически нормального образца взрослого человека, окрашенного CD3/CD16 + CD56/CD45 в пробирке TruCOUNT.

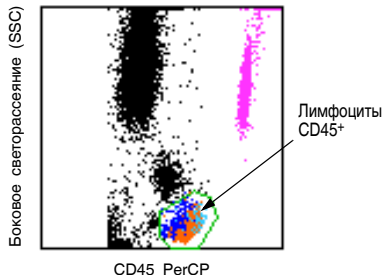


Рис. 1. Точечная диаграмма CD45 и SSC без гейтирования

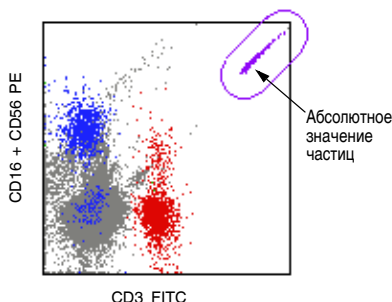


Рис. 2. Точечная диаграмма CD3 и CD16+56 с гейтом частиц TruCOUNT

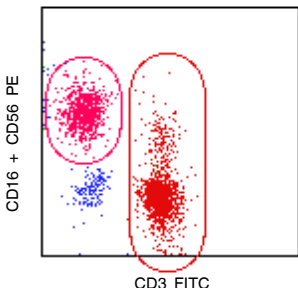


Рис. 3. Точечная диаграмма CD3 и CD16+56 с гейтированием по лимфоцитам

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты представлены в виде процентной доли положительных клеток в популяции лимфоцитов либо в виде количества положительных клеток на микролитр крови (абсолютное значение).

Расчет абсолютного значения

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

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

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

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Лаборатории должны установить свои собственные диапазоны нормальных значений для параметров TriTEST CD3/CD16 + CD56/CD45 reagent, на которые могут оказывать влияние пол пациента, его возраст и процедура подготовки образца. Расовая принадлежность пациента также может оказывать влияние,²⁹ хотя нет достаточных данных, подтверждающих этот факт. Для определения

нормального диапазона следует знать возраст, пол, клиническую картину заболевания и расовую принадлежность пациентов.³⁰ Указанные диапазоны нормальных значений носят только информационный характер.

2. TriTEST CD3/CD16 + CD56/CD45 reagent не валидирован для использования с жидкими антикоагулянтами гепарином и ACD (кислота-цитрат-декстроза) при расчете абсолютных показателей с использованием пробирок TruCOUNT.
3. TriTEST CD3/CD16 + CD56/CD45 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 CD3/CD16+56/CD45, представленные в таблице 1, были определены в лабораториях компании BD Biosciences в Сан-Хосе, штат Калифорния, а также четырех клинических центрах: Клинике Кливленда (Cleveland Clinic Foundation), Кливленд, штат Огайо; Госпитале Джонса 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 CD3/CD16 + CD56/CD45 для взрослых доноров с нормальными гематологическими характеристиками

Субпопуляция	n	Среднее значение	Нижний процентиль 2,5	Верхний процентиль 97,5
Естественные киллеры Т-лимфоцитов (%)	448	13	5	27
Общее количество Т-лимфоцитов (%)	516	72	55	84
Естественные киллеры (клеток/мкл) ^а	448	250	90	590
Всего Т-лимфоцитов (клеток/мкл) ^а	516	1410	690	2540

а. Абсолютные количества, 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

Результаты расчета процентных долей субпопуляции лимфоцитов, полученные с помощью TriTEST CD3/CD16 + CD56/CD45, сравнивались с результатами, полученными с использованием Simultest™

CD3/CD16 + CD56. Абсолютные количества лимфоцитов сравнивались с результатами, полученными методом Simultest CD3/CD16 + CD56, а также с полученными в гематологическом анализаторе.

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
Естественные киллеры (%)	167	0,92	-0,7 %, положительно	0,95	2—53
Всего Т-лимфоцитов (%)	167	0,93	5,2 %, положительно	0,96	26—94
Естественные киллеры (клеток/мкл)	166	0,91	-1 клетка/мкл	0,94	20—750 ^a
Общее количество Т-лимфоцитов (клеток/мкл)	166	0,94	109 клеток/мкл	0,94	100—3790 ^a

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

Воспроизводимость для одного образца

Оценивались 10 аликвот этих образцов, имеющих высокое, среднее и низкое количество CD4. % положительных результатов составил (SD = стандартное отклонение):

- % CD3: среднее = 66, сводное SD = 0,8
- % CD16 + CD56: среднее = 20, сводное SD = 0,4

Результаты подсчета абсолютных количеств представлены в таблице 3.

Табл. 3. Воспроизводимость для одного образца при использовании реагента CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19

Субпопуляция	Уровень*	Среднее значение	SD	CV (%)
Естественные киллеры (клеток/мкл)	Высокий	1360	55	4,1
	Средний	221	15	6,6
	Низкий	279	11	4,1
Всего Т-лимфоцитов (клеток/мкл)	Высокий	3311	149	4,5
	Средний	1897	88	4,6
	Низкий	635	20	3,2

Стабильность

Было проведено исследование стабильности рабочих характеристик реагента TrITEST во времени относительно спецификаций. В рамках исследования измеряли: 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,* компания BD рекомендует выполнять окрашивание и анализировать окрашенные образцы в пределах 6 часов после забора крови.

Перекрестная реактивность

Антиген CD16 экспрессируется на нейтрофилах.² Антиген CD56 присутствует приблизительно на 5 % CD3⁺ лимфоцитов периферической крови.²

Линейность

Линейность оценивалась в диапазоне концентраций лейкоцитов от $2,5 \times 10^3$

* Данные доступны в BD Biosciences.

до 31×10^3 клеток/мкл и концентраций лимфоцитов от $2,0 \times 10^2$ до $16,7 \times 10^3$ клеток/мкл. Линейность полученных результатов наблюдалась в пределах диапазонов $CD3^+CD16^+56^+$ от 43 до $3,9 \times 10^3$ клеток/мкл и $CD3^+$ от 122 до $11,2 \times 10^3$ клеток/мкл.

ГАРАНТИЯ

Для продаваемых согласно данным условиям продуктов гарантируется только соблюдение количества и содержания, 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

1. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. In: Ades E, Lopez C, eds. *Natural Killer Cells and Host Defense*. Basel: Karger, 1989:1.
2. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. 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.
3. 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.
4. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Three-color supplement to the NAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry*. 1996;26:227-230.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
12. Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. NK-cell antigens: section report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995;2:1367-1372.
13. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
14. 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.
15. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP, et al. Identification of a putative second T cell receptor. *Nature*. 1986;322:145-149.
16. 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.
17. 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.
18. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol*. 1991;146:4421-4426.
19. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.

20. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*. 1987;236:799-806.
21. Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
22. 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.
23. *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.
24. 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.
25. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document H3-A3.
26. *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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. *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.