



BD Tritest CD3 FITC/ CD8 PE/CD45 PerCP

Reagent

50 тестов на флакон — **кат. № 342410**

50 тестов на флакон с пробирками

BD Trucount — **кат. № 342441**

Для определения процентных долей и абсолютных значений Т-лимфоцитов и Т-супрессоров/Т-киллеров в лизированной цельной крови человека.

6/2010

23-13683-02



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 флуоресцеина изотиоцианат (FITC)/CD8 фикоэтрин (PE)/CD45 перидинин-хлорофилл протеин* (PerCP) является трехцветным реагентом прямой иммунофлуоресценции, предназначенным для использования с надлежащим образом оснащенным проточным цитометром для идентификации и определения процентных долей и абсолютных значений субпопуляций зрелых Т-лимфоцитов человека (CD3⁺) и Т-супрессоров/Т-киллеров (CD3⁺CD8⁺) в лизированной цельной крови. При использовании с пробирками BD Trucount™ абсолютные значения этих популяций могут быть подсчитаны в одной пробирке.

Реагент BD Tritest и пробирки BD Trucount могут использоваться с BD FACSTM Loader. Реагент может использоваться с либо без применения контроля изотипа.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

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

Клиническое применение

Лимфоциты-супрессоры/киллеры — субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3⁺), экспрессирующих антиген CD8⁺. Процентные доли и абсолютные количества CD3⁺CD8⁺ используются для оценки и мониторинга некоторых форм иммунодефицита¹⁻³ и аутоиммунных заболеваний.^{4, 5}

* Патенты — PerCP: США 4 876 190.

Процентная доля Т-супрессоров/Т-киллеров выходит за пределы нормального диапазона значений при некоторых аутоиммунных заболеваниях.⁶ Относительный удельный вес субпопуляции CD8⁺ повышен у многих пациентов с врожденным или приобретенным иммунодефицитом, таким как тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД)¹ или синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).⁷

Для определения процентной доли Т-лимфоцитов CD8⁺ у ВИЧ-инфицированных пациентов Центрами по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) рекомендуется использовать комбинации реагентов, содержащие антитела CD3 и CD8.⁸

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

При добавлении цельной крови к реагентам меченные флуорохромом антитела в реагенте 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 BD Tritest активируют флуоресценцию, делая возможным гейтирование прямой флуоресценции популяции лимфоцитов^{9–11} с целью снизить количество проникновений незелированных или ядродержащих эритроцитов в гейте.

При использовании пробирок BD Trucount определенный объем образца окрашивается непосредственно в пробирке BD Trucount. Лиюфилизованный осадок в пробирке растворяется, высвобождая

определенное число флуоресцентных частиц. Во время анализа абсолютное количество (клеток/??л) положительных клеток в образце определяется путем сравнения частоты встречаемости клеток и частиц. При использовании определенного программного обеспечения, например программного обеспечения BD Multiset™, абсолютные значения рассчитываются автоматически. При анализе данных вручную с использованием такого программного обеспечения, как BD CellQuest™, необходимо разделить количество подсчитанных положительных клеток на количество подсчитанных частиц, а затем умножить на концентрацию частиц BD Trucount.

4. РЕАГЕНТ

В комплекте реагент, достаточный для проведения 50 анализов

Реагент BD Tritest CD3/CD8/CD45 reagent поставляется в 1 мл буферного солевого раствора с бычьим сывороточным альбумином и 0,1 % азида натрия. Он содержит меченные FITC CD3, клон SK7,^{12–14} меченные PE CD8, клон SK1,^{15, 16} и меченные PerCP CD45, клон 2D1 (HLe-1).¹⁷

CD3 обнаруживает Т-лимфоциты и распознает эпсилон-цепь комплекса рецепторов антигена CD3/Т-клеточного антигена (ТкР).¹⁸ Этот комплекс состоит из не менее чем шести белков с молекулярной массой от 20 до 30 килодальтон (кДа).¹⁹ Антиген, распознаваемый антителами к CD3, нековалентно связан с ТкР α/β или γ/δ (от 70 до 90 кДа).²⁰

CD8 обнаруживает Т-супрессоры/Т-киллеры и распознает антиген, экспрессирующийся на α -субъединицах массой 32 кДа бимолекулярного комплекса, образованного сшивкой дисульфидными связями.²¹

Цитоплазматический домен α -субъединицы антигена CD8 связан с протеинтирозин-киназой p56^{lck}.²² CD8 взаимодействует с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, что приводит к увеличению адгезии между CD8⁺ Т-лимфоцитами и клетками-мишенями.^{23–25} Связывание антигена CD8 с молекулами ГКГС класса I усиливают активацию покоящихся Т-лимфоцитов.^{23–25}

CD45 обнаруживает лейкоциты и распознает антиген лейкоцитов человека молекулярной массой 180—220 кДа, который является членом семейства общих лейкоцитарных антигенов (LCA).²⁶

Антитела CD3, CD8 и CD45 состоят из мышинных тяжелых цепей γ_1 и легких kappa-цепей.

Каждая пробирка BD Trucount содержит лиофилизованные гранулы флуоресцентных частиц для одноразового использования. В каждом пакете BD Trucount содержится 25 пробирок, чего достаточно для проведения 25 анализов.

Меры предосторожности

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

ОСТОРОЖНО! Азид натрия вреден при приеме внутрь (R22). 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.

- **ОСТОРОЖНО!** Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные материалы. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{27, 28} 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.²⁹
- Необходим лизирующий раствор BD FACST[™] Lysing Solution^{*}, содержащий диэтиленгликоль и формальдегид. Предупредительные сообщения см. в листке-вкладыше.
- При использовании пробирок BD Trucount для получения точных результатов крайне важно добавлять точное количество крови. Откалибруйте пипетку, чтобы добавлять ровно 50 мкл образца, либо используйте технику обратного пипетирования (краткое описание см. в пункте шаг 3 на стр. 6). Для получения дополнительной информации см. инструкцию производителя пипетки.

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

- Содержание частиц в пробирках BD 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 BD Trucount. Не используйте пробирки из разных партий при проведении одного анализа.
- Пробирки BD Trucount разработаны для использования со специфичной процедурой лизирования без промывки. Для сбора данных не пытайтесь преодолеть порог прямого светорассеяния (FSC).

Хранение и обращение

- Реагент следует хранить при температуре 2—8 °С. Не использовать после даты истечения срока годности, указанной на этикетке.
- Реагент не замораживать и не подвергать воздействию прямого солнечного света при хранении или инкубации с клетками. Пробирка с реагентом должна оставаться сухой.
- Пробирки BD Trucount следует хранить в оригинальном пакете из полимерной пленки при температуре от 2 до 25 °С. Во избежание конденсации пакет следует открывать только после достижения им комнатной температуры и тщательно запечатывать сразу после извлечения пробирки. Проверяйте влагопоглотитель при каждом открывании пакета. Если влагопоглотитель изменил цвет с голубого на бледно-лиловый, утилизируйте оставшиеся пробирки. Закрытый пакет стабилен до истечения срока годности, указанного на упаковке. После истечения срока годности не

открывать и не использовать. Пробирки использовать в течение 1 часа после извлечения из пакета. Оставшиеся пробирки использовать в течение 1 месяца после вскрытия пакета.

5. ПРИБОР

Реагент BD Tritest CD3/CD8/CD45 и пробирки BD Trucount предназначены для использования с проточным цитометром, оборудованном соответствующими техническими средствами и программным обеспечением. Компания BD рекомендует проточные цитометры BD FACSCalibur™, BD FACSort™ или BD FACScan™. Однако при использовании других платформ также можно получить результаты. Проточный цитометр должен быть оснащен лазером с длиной волны 488 нм, 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 > 650 нм. С данным прибором можно также использовать BD FACS Loader.

Перед эксплуатацией используйте частицы BD Calibrite™ Beads и программное обеспечение BD FACSComp™ версии 2.0 или более поздней для настройки напряжений фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), установок компенсации флуоресценции и проверки прибора на чувствительность. Операторам проточных цитометров производства других компаний (кроме BD) следует обратиться к инструкции производителя по настройке трехцветного иммунофенотипирования.

В компании BD разработано программное обеспечение, такое как программное обеспечение BD Multiset, автоматически рассчитывающее абсолютные значения при использовании пробирок BD 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 ОБРАЗЦОВ

Отберите кровь путем венопункции^{30, 31} с соблюдением правил асептики в стерильную пробирку для забора крови BD Vacutainer™ с EDTA. BD Tritest CD3/CD8/CD45 reagent и пробирки BD Trucount проверены как с жидкой, так и с сухой формой EDTA.

Для анализа необходимо не менее 100 мкл цельной крови. Соблюдайте инструкции производителя пробирки для забора крови в отношении минимального объема крови, который необходимо отобрать, чтобы обеспечить нужное разбавление образца, особенно при определении абсолютного количества с использованием частиц BD 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. раздел «Линейность» на page 10) или чтобы посчитать абсолютные значения по процентным долям.

Антикоагулированную кровь, 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 течение 24 часов с момента взятия, они могут быть

проанализированы в течение 24 часов с момента окрашивания.

Мешающие факторы

Не используйте ранее зафиксированные и хранившиеся образцы от пациентов. Образцы крови, охлажденные перед окрашиванием, могут давать искаженные результаты. Образцы, полученные от пациентов, принимающих иммунодепрессанты могут привести к низкому разрешению.³² Бластные клетки могут влиять на результаты теста. Следует отказаться от использования гемолизированных образцов.

7. ПРОЦЕДУРА

Поставляемый реагент

- BD Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP (BD кат. № 342410) или BD Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP с пробирками BD Trucount (BD кат. № 342441)

Необходимые реагенты и материалы, не входящие в комплект

- Частицы CaliBRITE 3 (BD кат. № 340486).
- BD FACS Lysing Solution (10-кратный), 100 мл (BD кат. № 349202).

Инструкции по разведению и предостережения см. на вкладыше.

- Чистая вода (дистиллированная или деионизированная).
- Пробирки BD Vacutainer с EDTA для забора крови.
- Одноразовые полистироловые пробирки BD Falcon™ 12 x 75 мм с крышками (BD кат. № 352058) или эквивалентные, если не используются пробирки BD Trucount.
- Вихревая мешалка «вортекс».
- Дозатор с наконечниками.

- Дозатор масс или пипеточный дозатор (450 ??л) для дозирования BD FACS Lysing Solution.
- Проточная жидкость (BD FACStow™, BD кат. № 340398 для США и Латинской Америки или 342003, или эквивалентная).
- Контрольные образцы BD Trucount (BD кат. № 340335), необходимые при использовании пробирок BD Trucount.
- Контрольный образец лизируемой цельной крови (имеется в продаже).

Окрашивание клеток

Для оценки объема неспецифического связывания антител реагент BD Tritest может использоваться с либо без применения контроля изотипа. При необходимости использовать контроль доступен реагент контроля изотипа BD Tritest $\gamma_1/\gamma_1/CD45$ (BD кат. № 342415).

Окрашивание

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

Для абсолютных количеств вместо пробирки 12 x 75 мм пометьте пробирку BD Trucount.

ПРИМЕЧАНИЕ. Перед использованием следует удостовериться в том, что осадок частиц BD Trucount интактен и находится в пределах металлической сеточки на дне пробирки. Если это не так, утилизируйте пробирку BD Trucount и используйте новую. Не переносите частицы в другую пробирку.

2. Внесите 20 ??л BD Tritest CD3/CD8/CD45 reagent на дно пробирки.

При использовании пробирки BD Trucount внесите чуть выше

сеточки из нержавеющей стали. Не прикасайтесь к осадку.

3. Внесите 50 ??л хорошо перемешанной цельной крови с антикоагулянтом в нижнюю часть пробирки.

ПРИМЕЧАНИЕ. Не допускайте растекания крови по стенкам пробирки. Если цельная кровь останется на стенках трубки, она не будет окрашена реагентом, что может повлиять на результаты.

Аккуратное внесение особенно важно при использовании пробирки BD Trucount. Используйте технику обратного пипетирования для внесения образца на стенку пробирки чуть выше сеточки.

Для обратного пипетирования нажмите кнопку до второго упора. После отпускания кнопки образец поступает в наконечник с избытком. Нажмите кнопку до первого упора, чтобы выдать точный объем образца. Избыток образца останется в наконечнике.

4. Закройте пробирку и аккуратно перемешайте на вортексе.

Инкубируйте в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).

5. Добавьте в пробирку 450 ??л однократного BD FACS Lysing Solution.
6. Закройте пробирку и аккуратно перемешайте на вортексе.
7. Инкубируйте в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 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 (от 20 до 25 °C).

Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки на вортексе на малой скорости.³³ При использовании BD FACS Loader перемешайте содержимое пробирок на вортексе непосредственно перед их размещением в подставки загрузчика. Получите и проанализируйте данные, используя соответствующее программное обеспечение, например программное обеспечение BD CellQuest или BD 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.³¹ Для установки маркеров флуоресценции с целью выявления наличия неспецифического окрашивания можно использовать реагент контроля изотипа BD Tritest.

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 отсутствует либо очень слабое разделение между кластерами.

На рис. 1, 2 и 3 (page 7 и 8) изображены репрезентативные данные гематологически нормального образца взрослого человека, окрашенного BD Tritest CD3/CD8/CD45 в пробирке BD Trucount.

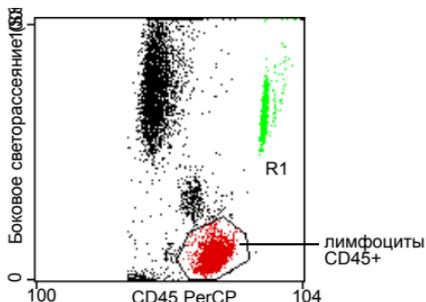


Рис. 1. Точечная диаграмма негейтированных CD45 и SSC

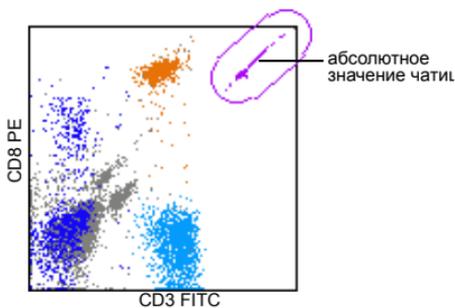


Рис. 2. Точечная диаграмма негейтированных CD3 и CD8

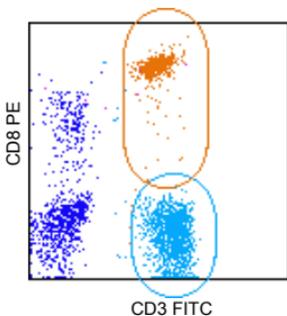


Рис. 3. Точечная диаграмма лимфоцит-гейтированных CD3 и CD8

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 программного обеспечения BD Multiset абсолютные значения рассчитываются автоматически.

При анализе данных вручную с использованием такого программного обеспечения, как BD CellQuest™, или другого, необходимо разделить количество подсчитанных положительных клеток на количество подсчитанных частиц, а затем умножить на концентрацию частиц BD Trucount.

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

* Это значение указано на этикетке пакета с пробирками BD Trucount и в различных партиях может варьироваться.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Лаборатории должны устанавливать свои собственные диапазоны нормальных значений параметров BD Tritest CD3/CD4/CD45 reagent, на которые могут оказывать влияние пол пациента, его возраст и процедура подготовки образца. Расовая принадлежность пациента³⁴ и индивидуальные вариации экспрессии эпитопов³⁵ также могут оказывать влияние, хотя в настоящее время недостаточно данных для подтверждения данного факта. Возраст, пол, клиническое состояние и расовая принадлежность пациента должны быть известны при определении диапазона нормальных значений.³⁶ Указанные диапазоны нормальных значений несут только информационный характер.
- BD Tritest CD3/CD8/CD45 reagent не валидирован компанией BD Biosciences для использования с жидкими антикоагулянтами гепарином и цитратным антикоагулянтом с декстрозой (ACD) при расчете абсолютных величин с использованием пробирок BD Trucount.
- BD Tritest CD3/CD8/CD45 reagent не предназначен для скрининга образцов на наличие лейкозных клеток или для использования с образцами для фенотипирования пациентов, больных лейкемией.
- Абсолютные значения различны в лабораториях, использующих оборудование разных производителей.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Нормальные диапазоны

Нормальные значения для CD3/CD8/CD45, представленные в табл. 1, были определены в компании BD Biosciences в Сан Хосе,

штат Калифорния, США, и в четырех клинических центрах: Cleveland Clinic Foundation, Кливленд, штат Оклахома, США; Johns Hopkins Hospital, Балтимор, штат Мэриленд, США; Institute of Tropical Medicine, Антверпен, Бельгия; University of North Carolina Hospital, Чапел Хилл, штат Северная Каролина, США. Субъектами выступали взрослые здоровые люди в возрасте от 18 до 65 лет.

Данные нормальные диапазоны являются объединенными. Для более подробной информации о нормальных диапазонах, полученных в процессе данного исследования, свяжитесь с отделом обслуживания клиентов компании BD. Дополнительная 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 в Сан Хосе, штат Калифорния, США, в сторонних клинических центрах США или Европы, или в нескольких центрах одновременно.

Табл. 1. Репрезентативные нормальные диапазоны для BD Tritest CD3/CD8/CD45 взрослых доноров с нормальными гематологическими характеристиками

Субпопуляция	n	Среднее значение	Нижний перцентиль 2,5	Верхний перцентиль 97,5
Т-супрессоры/Т-киллеры (%)	523	25	13	41
Всего Т-лимфоцитов (%)	516	72	55	84
Т-супрессоры/Т-киллеры (клеток/??л) ^а	523	490	190	1140
Всего Т-лимфоцитов (клеток/??л) ^а	516	1410	690	2540

а. Абсолютные значения округлены до ближайших 10 клеток/мкл.

Точность

Результаты подсчета процентных долей субпопуляции лимфоцитов для BD Tritest CD3/CD8/CD45 сравнивались с результатами для BD Simultest™ CD3/CD8. Абсолютные значения сравнивались с результатами прибора BD FACSCount™.

Были проанализированы аликвоты образцов крови доноров с нормальными и аномальными показателями. Статистика регрессии, приведенная в табл. 2, показывает практически эквивалентные результаты.

Табл. 2. Регрессионный анализ

Субпопуляция	n	Наклон	Точка пересечения с осью ординат	R	Диапазон
Т-супрессоры/Т-киллеры (%)	168	0,98	0,2 %, положительно	0,99	15—84
Всего Т-лимфоцитов (%)	168	0,92	6,3 %, положительно	0,97	26—94
Т-супрессоры/Т-киллеры (клеток/??л)	194	1,06	-10 клеток/??л	0,98	70—1980 ^а
Всего Т-лимфоцитов (клеток/??л)	197	1,04	-11 клеток/??л	0,99	120—2860 ^а

а. Абсолютные значения округлены до ближайших 10 клеток/мкл.

Воспроизводимость для одного образца

Оценивалось десять аликвот трех образцов, имеющих высокое, среднее и низкое количество CD4. % положительных результаты были следующими (SD = стандартное отклонение):

- %CD3: среднее значение = 71, общее SD = 1,1
- %CD8: среднее значение = 22, общее SD = 1,0

Результаты для абсолютных величин приведены в табл. 3.

Табл. 3. Воспроизводимость для одного образца абсолютных значений для реагента BD Tritest CD3/CD8/CD45

Субпопуляция	Уровень	Среднее значение	SD	%CV
Т-супрессоры/ Т-киллеры (клеток/??л)	Высокий	713	82,2	11,5
	Средний	455	27,5	6,1
	Низкий	321	29,9	9,3
Всего Т-лимфоцитов (клеток/??л)	Высокий	2734	262,7	9,6
	Средний	1851	84,9	4,6
	Низкий	708	51,2	7,2

Стабильность

Для оценки влияния времени на рабочие характеристики реагента BD Tritest было проведено исследование. В процессе исследования измерялись: 1) изменения, связанные с хранением цельной крови перед окрашиванием; 2) изменения по прошествии времени между окрашиванием и сбором данных; 3) совмещения этих двух эффектов.

Основываясь на результатах исследования, рекомендуется* проводить окрашивание в пределах 48 часов после забора и

анализировать окрашенные образцы в пределах 6 часов после окрашивания, или проводить окрашивание в пределах 24 часов после забора и анализировать окрашенные образцы в пределах 24 часов после окрашивания.

Перекрестная реактивность

Антитела к CD8 реагируют с НК-лимфоцитами³⁷, а также с Т-супрессорами/Т-киллерами.

Линейность

Линейность оценивалась путем тестирования концентрации лейкоцитов в пределах от $2,5 \times 10^3$ до 31×10^3 лейкоцитов/??л и концентрации лимфоцитов в пределах от $2,0 \times 10^2$ до $16,7 \times 10^3$ лимфоцитов/??л. Результаты были линейными для диапазона CD3⁺CD8⁺ (от 43 до $3,9 \times 10^3$ клеток/??л) и для диапазона CD3⁺ (от 122 до $11,2 \times 10^3$ клеток/??л).

ГАРАНТИЯ

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

для продаваемых согласно данным условиям продуктов ГАРАНТИРУЕТСЯ ТОЛЬКО СОБЛЮЖДЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И СОДЕРЖИМОГО, УКАЗАННЫХ НА ЭТИКЕТКЕ ИЛИ МАРКИРОВКЕ ПРОДУКТА НА МОМЕНТ ДОСТАВКИ ЗАКАЗЧИКУ. НАСТОЯЩИМ КОМПАНИЯ BD ОТВЕРГАЕТ ЛЮБЫЕ ДРУГИЕ ГАРАНТИИ, ЯВНЫЕ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫЕ, ВКЛЮЧАЯ ГАРАНТИИ КОММЕРЧЕСКОЙ ВЫГОДНОСТИ, ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ КОНКРЕТНЫХ ЦЕЛЕЙ И НАРУШЕНИЯ ПРАВ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ. ВСЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ ВО ОГРАНИЧИВАЕТСЯ ЛИБО ЗАМЕНОЙ ПРОДУКТОВ, ЛИБО ВОЗМЕЩЕНИЕМ ПОКУПАТЕЛЮ ПОКУПНОЙ ЦЕНЫ. КОМПАНИЯ BD НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА ПОВРЕЖДЕНИЕ ИМУЩЕСТВА ИЛИ ЛЮБОЙ СОПУТСТВУЮЩИЙ ИЛИ КОСВЕННЫЙ УЩЕРБ, ВКЛЮЧАЯ ЛИЧНЫЕ ТРАВМЫ И ЭКОНОМИЧЕСКИЙ УБЫТОК, ВЫЗВАННЫЕ ДАННЫМ ПРОДУКТОМ.

* Данные доступны в компании BD Biosciences.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
- 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.
- Foucar K, Goeken JA. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Med*. 1982;13:403-413.
- Cohen SB, Weetman AP. Activated interstitial and intraepithelial thyroid lymphocytes in autoimmune thyroid disease. *Acta Endocrinol*. 1988;119:161-166.
- 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.
- 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.
- Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:55-61.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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;1:3-30.
- 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.
- Knowles RW. Immunohistochemical 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.
- 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.
- 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.
- Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, ed. *Leukocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
- 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.
- Brenner MB, McClean J, Dialynas DP, et al. Identification of a putative second T cell receptor. *Nature*. 1986;322:145-149.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

25. 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.
26. Schwitzer 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.
27. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections—Second Edition; Approved Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2001. NCCLS document M29-A2.
28. 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.
29. 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.
30. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture—Fourth Edition; Approved Standard.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.
31. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes: Approved Guideline.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H42-A.
32. 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.
33. 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.
34. 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;3:33-37.
35. Angadi CV. Lack of Leu-3a epitope on T-helper (CD4) lymphocytes. *J Clin Lab Anal.* 1990;4:193-195.
36. *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Second Edition.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000. NCCLS document C28-A2.
37. 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.