

IOTest® CD3-FITC

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07746

100 тестов; 2 мл

20 мкл / тест



IOTest
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO



| Спецификации | |
|----------------|--|
| Специфичность | CD3 |
| Клон | UCHT1 |
| Гибридома | NS1 x Balb/c |
| Иммуноген | Лимфоциты периферической крови |
| Иммуноглобулин | IgG1 |
| Вид животных | Мышь |
| Источник | Асциты |
| Способ очистки | Аффинная хроматография с иммобилизованным белком А |
| Флуорохром | Флуоресцинизоцианат (FITC) |
| λ возбуждения | 488 нм |
| Пик эмиссии | 525 нм |
| Буфер | PBS pH 7.2, БСА 2 мг/мл, 0.1% NaN ₃ |

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела позволяют идентифицировать клетки, экспрессирующие антиген CD3, и выполнить их подсчет. Для анализа используются биологические образцы человека. Исследование проводится методом проточной цитофлуориметрии.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами на поверхности лейкоцитов.

При инкубации образца с реагентом IOTest происходит окрашивание лейкоцитов. Затем выполняется лизис эритроцитов. Интактные лейкоциты анализируются на проточном цитофлуориметре.

Проточный цитометр измеряет светорассеяние и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить интересующую популяцию на диаграмме, отображающей светорассеяние в боковом направлении (Side Scatter или SS) и светорассеяние в прямом направлении под малыми углами (Forward Scatter или FS). Для выбора анализируемых популяций можно использовать различные двупараметровые диаграммы в зависимости от используемого приложения.

Прибор выполняет анализ флуоресценции выбранной популяции, распознавая окрашенные и неокрашенные клетки. Результат представляется в виде процентного содержания положительных клеток от всех клеток выбранной популяции.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Антиген CD3 представляет собой белковый комплекс, состоящий из 5 полипептидных цепей (γ, δ, ε, ζ, η) и связанный с T-клеточным рецептором (1, 2). CD3 экспрессируется только на T-лимфоцитах и на субпопуляции тимоцитов (3). В периферической крови 67 - 76% лимфоцитов CD3⁺; это значение зависит от возраста, у детей младшего возраста оно меньше (4).

Данный реагент позволяет охарактеризовать и выполнить подсчет T-лимфоцитов при расстройствах иммунной системы: иммунодефицитных состояниях, аутоиммунных заболеваниях, реакциях гиперчувствительности, вирусных инфекциях, восстановлении иммунного ответа после трансплантации костного мозга и/или органов. Также реагент используется в случае злокачественных заболеваний крови, таких как лейкоз и лимфома, для фенотипирования популяций CD3⁺-клеток и контроля хода лечения (5 - 8).

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

До и после распечатки флакона жидкие конъюгаты антител необходимо хранить при температуре 2 - 8°C в защищенном от света месте.

Стабильность нераспечатанного реагента приводится на этикетке флакона.

Стабильность распечатанного реагента 90 дней.

ВНИМАНИЕ

1. Не используйте реагент с истекшим сроком годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием необходимо уравновесить реагент при комнатной температуре (18 - 25°C).
4. Воздействие света необходимо свести к минимуму.
5. Избегайте контаминации микроорганизмами, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN₃), требуют осторожного обращения. Не проглатывайте, избегайте любого контакта с кожей, слизистой оболочкой и глазами. В кислой среде азид натрия способен образовывать взрывоопасную азотисто-водородную кислоту. При утилизации перед сливом в водопровод рекомендуется развести реагент большим объемом воды. Это позволит избежать накопления азид натрия в металлических трубах и предотвратит образование взрывчатого вещества.
7. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные. При работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности (в частности, использовать защитные перчатки, халат и очки).
8. Никогда не отбирайте образец через пипетку ртом. Избегайте контакта образца с кожей, слизистой оболочкой и глазами.
9. После завершения работы пробирки с кровью и все одноразовые материалы необходимо поместить в специальные контейнеры для утилизации.

ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отобрать в стерильные пробирки с солью EDTA в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

Образцы должны храниться при комнатной температуре (18 - 25°C). Встряхивание образцов не допускается. Перед отбором аликвоты образец следует гомогенизировать, аккуратно перемешав.

Анализ образцов необходимо выполнить в течение 24 часов после отбора.

МЕТОДИКА

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Пробирки и материалы для отбора проб.
- Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками на 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные частицы: флуоросферы Flow-Set™ (кат. № 6607007).
- Реагент для лизиса эритроцитов (с предусмотренной стадией отмывки после лизиса). Например: VersaLyse (кат. № A09777).
- Реагент для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800).
- Изотипический контроль: IOTest reagent. IgG1-FITC (кат. № A07795).
- Буфер (PBS: 0.01 M фосфат натрия; 0.145 M хлорид натрия; pH 7.2).
- Центрифуга.
- Миксер (вортекс).

- Проточный цитофлуориметр.

ПОДГОТОВКА ПРОБ

ЗАМЕЧАНИЕ: Приведенная ниже процедура пригодна для стандартных исследований. При выполнении некоторых приложений Beckman Coulter объем образца и/или реагента VersaLyse может отличаться. В этом случае следуйте указаниям руководства для конкретного приложения.

При исследовании любого образца необходимо также проанализировать контрольный образец (исследуемый образец плюс изотипический контроль, кат. № A07795).

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител IOTest, а в пробирки для анализа контролей - по 20 мкл соответствующего изотипического контроля.
2. В пробирки для анализа образца и для анализа изотипического контроля добавьте по 100 мкл образца. Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируйте в течение 15 - 20 минут при комнатной температуре (18 - 25°C) в защищенном от света месте.
4. Если требуется, выполните лизис эритроцитов, следуя рекомендациям изготовителя лизирующего реагента. Например, при использовании реагента VersaLyse (кат. № A09777) следуйте указаниям инструкции к этому реагенту. **Рекомендуется выполнить процедуру «с одновременной фиксацией».** Для этого добавьте к образцу 1 мл свежеприготовленного раствора для фиксации и лизиса. Немедленно перемешайте на вортексе в течение 1 секунды. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Если образец не содержит эритроцитов, добавьте 2 мл PBS.

5. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 150 x g при комнатной температуре.
6. Удалите супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.
9. Удалите супернатант аспирацией и ресуспендируйте клетки:
 - в 0.5 или 1 мл PBS с 0.1% раствором формальдегида, если подготовленная проба будет храниться от 2 до 24 часов. (Данный раствор можно получить разведением 12.5 мкл реагента IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800) в 10-кратной концентрации в 1 мл PBS.)
 - в 0.5 или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

ЗАМЕЧАНИЕ: Независимо от способа подготовки, подготовленные пробы необходимо хранить при температуре 2 - 8°C в защищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональные антитела (mAb) UCST1 реагируют с ϵ -цепью комплекса CD3 (9).

В 1982 г. на Первом международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Париже, Франция, было подтверждено, что mAb UCST1 направлены против CD3 (WS Code: 3, Section T) (10).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны положительные клетки линии HPBALL и отрицательные клетки линии RAMOS. Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии с описанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия. Уравнение регрессии можно использовать для определения линейности и диапазона измерений.

| Маркер | Линейная регрессия | Линейность (R ²) | Диапазон (%) |
|--------|----------------------|------------------------------|--------------|
| CD3 | $Y = 0.991 X + 1.28$ | 0.999 | 1 – 99 |

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна определить собственные диапазоны нормальных значений на основании исследования образцов нормальных доноров местной популяции. При этом следует учитывать возраст, пол и этническую принадлежность доноров, а также другие местные особенности населения.

В наших лабораториях с использованием данного реагента было проведено исследование образцов 50 взрослых людей. В следующей таблице представлены результаты подсчета положительных событий:

| Лимфоциты | Количество образцов | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-----------|---------------------|-------------|-----|--------|
| CD3+ | 50 | 72.9 | 9.1 | 12.5 |

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитометре определялось процентное содержание окрашенных положительных клеток (CD3 лимфоцитов периферической крови). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующей таблице:

| Положительные лимфоциты | Количество измерений | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-------------------------|----------------------|-------------|------|--------|
| CD3+ | 12 | 65.7 | 1.03 | 1.6 |

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на двух цитометрах двумя лаборантами определялось процентное содержание окрашенных клеток одной популяции (CD3 лимфоцитов периферической крови). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующих таблицах:

Цитометр # 1

| Положительные лимфоциты | Количество измерений | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-------------------------|----------------------|-------------|------|--------|
| CD3+ | 12 | 65.7 | 1.03 | 1.6 |

Цитометр # 2

| Положительные лимфоциты | Количество измерений | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-------------------------|----------------------|-------------|-----|--------|
| CD3+ | 12 | 68.0 | 0.5 | 2.1 |

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном расположении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры без отмывки.

3. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и следовать нормам лабораторной работы.

4. Антитела данного реагента откалиброваны для получения наилучшего соотношения специфического и неспецифического сигнала. Поэтому в каждом исследовании необходимо строго дозировать указанный объем реагента с учетом количества клеток в образце.

5. При гиперлейкоцитозе разведите образец PBS так, чтобы получить примерную концентрацию лейкоцитов 5×10^9 /л.

6. При некоторых заболеваниях, таких как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатии, лизис эритроцитов может происходить медленно, не полностью или совсем не происходить. В этом случае перед окрашиванием рекомендуется выделить мононуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фикола).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В приложении приводится список литературы и примеры диаграмм.

ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER, EPICS, EXPO, Flow-Set, IOTest, System II, XL являются зарегистрированными торговыми знаками компании Beckman Coulter Inc.

ИЗГОТОВЛЕНО:

IMMUNOTECH S.A.
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France

Отдел по работе с клиентами: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

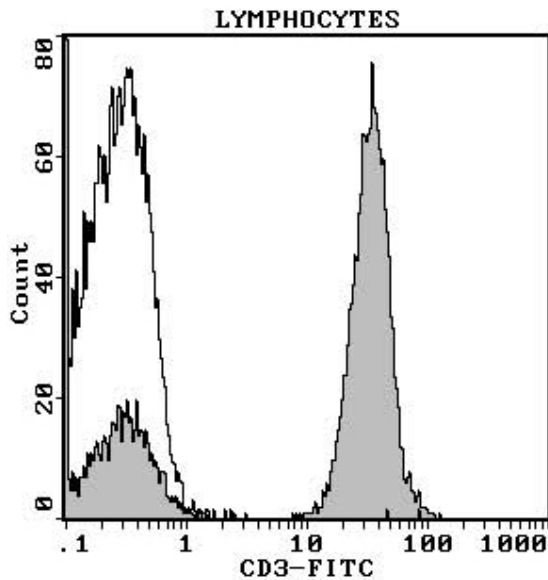


ПРИЛОЖЕНИЕ К РУКОВОДСТВУ № A07746

ПРИМЕРЫ ДИАГРАММ

Ниже показаны однопараметровые гистограммы (количество клеток – интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовались конъюгаты антител IOTest CD3-FITC (кат. № A07746). Выполнялось выделение лимфоцитов программными средствами. Изотипический контроль - конъюгаты FITC с мышинным IgG1 (кат. № A07795) показаны белым цветом.

Считывание и анализ данных выполнены с помощью проточного цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ в программном обеспечении System II™.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thibault, G., Bardos, P., "Compared TCR and CD3 ϵ expression on $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3 ϵ chains in the TCR/CD3 complex", 1995, *J. Immunol.*, 154, 3814-3820.
2. Shores, E.W., Love, P.E., "TCR ζ -chain in T cell development and selection", 1997, *Cur. Opin. Immunol.*, 9, 380-389.
3. van Agthoven, A., Terhorst, C., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F., "Characterization of T cell surface glycoproteins T1 and T3 present on all human peripheral T lymphocytes and functional mature T lymphocytes", 1981, *Eur. J. Immunol.*, 11, 18-21.
4. Hannel, I., Erkeller-Yuksel, F., Lydyard, P., Deneys, V., DeBruyère, M., "Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations", 1992, *Immunol. Today*, 6, 13, 215-218.
5. Rothe, G., Schmitz, G., Adorf, D., Barlage, S., Gramatzki, M., Höffkes, H.G., Janossy, G., Knüchel, R., Ludwig, W.D., Nebe, T., Nerl, C., Orfao, A., Serke, S., Sonnen, R., Tichelli, A., Wörmann, B., "Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies", 1996, *Leukemia*, 10, 877-895.
6. Nicholson, J.K.A., Hearn, T.L., Cross, G.D., White, M.D., "1997 Revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV)", 1997, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, RR-2, 46, 1-29.
7. Bray, R.A., Gebel, H.M., "Applications of flow cytometry to transplantation of solid organs", 1990, *Labmedica*, Feb/March, 28-30.
8. Velardi, A., Terenzi, A., Cucciaioni, S., Millo, R., Grossi, C.E., Grignani, F., Martelli, M.F., "Imbalance within the peripheral blood T-helper (CD4+) and T-suppressor (CD8+) cell populations in the reconstitution phase after human bone marrow transplantation", 1988, *Blood*, 5, 71, 1196-1200.
9. Tunnacliffe, A., Olsson, C., Traunecker, A., Krissansen, G.W., Karjalainen, K., De la Hera, A., "The majority of CD3 epitopes are conferred by the ϵ chain", 1989, *Leucocyte Typing IV*, White Cell Differentiation Antigens. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 295-296.
10. Bernard, A., Brottier, P., Georget, E., Lepage, V., Boumsell, L., "Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories", 1984, *Leucocyte Typing I*, Bernard, A. et al., Springer Verlag, 9-135.