

ЮТест® CD4-FITC

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07750

100 тестов; 2 мл

20 мкл / тест



ЮТест
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO



Спецификации	
Специфичность	CD4
Клон	13B8.2
Гибридома	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Тимоциты человека
Иммуноглобулин	IgG1
Вид животных	Мышь
Источник	Асциты
Способ очистки	Аффинная хроматография с иммобилизованным белком А
Флуорохром	Флуоресцинизоотиоцианат (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 CD4, 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 ЮТест 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 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

Данный реагент позволяет охарактеризовать и выполнить подсчет CD4⁺ лимфоцитов при расстройствах иммунной системы: СПИДе (1) и других иммунодефицитных состояниях, аутоиммунных заболеваниях (2), 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 контроля хода лечения и фенотипирования популяций CD4⁺-клеток (3).

При ВИЧ-инфекции и других синдромах иммунодефицита подсчет клеток CD4⁺ позволяет четко контролировать ход заболевания и помогает выработать стратегию лечения (4).

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 азидов 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: ЮТест 3 Fixative Solution (кат. № A07800).
- Изотипический контроль: ЮТест reagent. IgG1-FITC (кат. № A07795).
- Буфер (PBS: 0.01 М фосфат натрия; 0.145 М 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 ЮТест, 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 ЮТест 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 (мАт) 13В8.2 распознают эпитоп, расположенный на иммуноглобулиноподобном домене V1 антигена CD4. Исследование карты эпитопов с помощью мутаций внецитоплазматических регионов молекулы показало, что только мутации 88 и/или 89 остатков влияют на фиксацию мАт 13В8.2 (5). МАт 13В8.2 ингибируют фиксацию HIV-1 in vitro.

В 1986 г. на Третьем международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Оксфорде, Англия, было подтверждено, что мАт 13В8.2 направлены против CD4 (WS Code : 501, Section : T) (6).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны положительные клетки линии HPBALL и отрицательные клетки линии DAUDI. 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 (%)
CD4	$Y = 0.98 X + 1.46$	0.9999	2 – 98

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 следующих таблицах представлены результаты подсчета положительных событий:

Лимфоциты	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD4+	50	55.91	10.82	19.35

Моноциты	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD4+	50	90.86	4.97	5.47

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD4+	12	35.76	1.17	3.3

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на двух цитометрах двумя лаборантами определялось процентное содержание положительных клеток (лимфоцитов). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующих таблицах:

Цитометр # 1

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD4+	12	35.76	1.17	3.3

Цитометр # 2

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD4+	12	36.72	0.88	2.4

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 $5 \times 10^9/л$.
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.

BD FACScan является зарегистрированным торговым знаком компании BD Biosciences and Company.

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

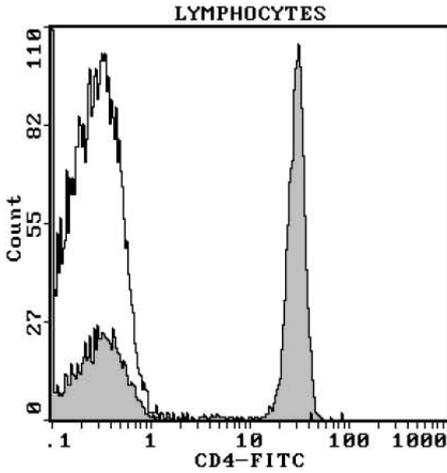
www.beckmancoulter.com



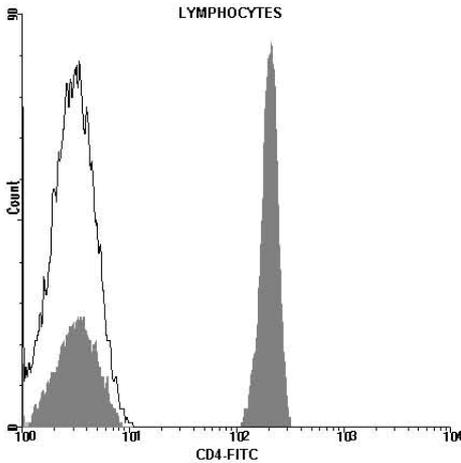
ПРИМЕРЫ ДИАГРАММ

Ниже показаны однопараметровые гистограммы (количество клеток – интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовались конъюгаты антител IOTest CD4-FITC (кат. № A07750). Выполнялось выделение лимфоцитов программными средствами. Изотипический контроль - конъюгаты FITC с мышинным IgG1 (кат. № A07795), показан белым цветом.

Гистограмма 1. Считывание и анализ данных выполнены с помощью проточного цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ в программном обеспечении System II™.



Гистограмма 2. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра Becton Dickinson FACScan™.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fauci, A.S., "The human immunodeficiency virus, infectivity and mechanism of pathogenesis", 1988, Science, 239, 617-622.
2. Terhorst, C., van Agthoven, A., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F., "Biochemical analysis of human T lymphocyte : Differentiation antigens T4 and T5", 1980, Science, reprint, 209, 520-521.
3. Vaickus, L., Ball, E.D., Foon, K.A., "Immune markers in hematologic malignancies", 1991, Critical reviews in oncology/hematology, 11, 267-297.
4. Fahey, J.L., Taylor, J.M.G., Detels, R., Hofmann, B., Melmed, R., Nishanian, P., Giorgi, J.V., "The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1", 1990, N. Engl. J. Med, 3, 322, 166-172.
5. Sprent, J., "T lymphocytes and the thymus", 1989, Fundamental Immunology, Chap 4, 2nd Ed., 69-93.
6. Taylor, G.M., Williams, A., Morten, J., Morten, H., "Analysis of CD4 monoclonal antibodies using human X mouse hybrid cell-lines OKT4", 1987, Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens, A.J. McMichael, p. 234-238.