

# IOTest® CD8-PE

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07757

100 тестов; 2 мл  
20 мкл / тест



IOTest  
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ  
IN VITRO



	Спецификации
Специфичность	CD8
Клон	B9.11
Гибридома	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Клон цитотоксических Т-клеток HLA A2
Иммуноглобулин	IgG1
Вид животных	Мышь
Источник	Асциты
Способ очистки	Аффинная хроматография с иммобилизованным белком А
Флуорохром	Фикоэритрин R (PE)
λ возбуждения	488 нм
Пик эмиссии	575 нм
Буфер	PBS pH 7.2, BCA 2 мг/мл, 0.1% NaN <sub>3</sub>

## НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела используются для цитофлуориметрического анализа биологических образцов человека. Они позволяют идентифицировать клетки, экспрессирующие CD8, и выполнить их подсчет.

## 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 двухпараметровые 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 CD8 экспрессируется примерно на 30% лимфоцитов периферической крови здоровых людей (1), 80% тимоцитов (2) и на 15-30% лимфоцитов костного мозга (3). В периферической крови данные антитела позволяют идентифицировать цитотоксические Т-лимфоциты-супрессоры (Tc) и субпопуляцию естественных киллеров (ЕК). Последние экспрессируют CD8 в меньшей степени, чем Tc (4, 5).

Данный реагент позволяет охарактеризовать и подсчитать лимфоциты CD8<sup>+</sup> субпопуляции при нарушениях иммунной системы: при иммунодефицитных состояниях, аутоиммунных заболеваниях, реакциях гиперчувствительности, вирусных инфекциях, восстановлении иммунной системы после пересадки костного мозга. Также он позволяет провести фенотипирование субпопуляций CD8<sup>+</sup> и наблюдение за пациентом при злокачественных заболеваниях крови, таких как лимфома и лейкоз (6 - 9).

## 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 (NaN<sub>3</sub>), 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-PE (кат. № A07796).
- 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. № A07796).

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), добавьте к образцу 1 мл данного реагента. Немедленно перемешайте на вортексе и инкубируйте в течение 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 300 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 0.8% раствором формальдегида или фиксирующего раствора, например, IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800), в рабочей концентрации (1X), если подготовленная проба будет храниться от 2 до 24 часов.

– 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 B9.11 реагируют с  $\alpha$ -субъединицей гетеродимера CD8 (2).

В 1982 г. на Первом международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Париже, Франция, было подтверждено, что мАт B9.11 направлены против CD8 (WS Code: 43, Section T) (10).

## 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 (%)
CD8	$Y = 0.991 X - 0.22$	0.999	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 следующей таблице представлены результаты подсчета положительных событий:

Лимфоциты	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD8+	50	16.1	5.6	34.7

## ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD8+	12	30.2	0.4	1.3

## МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

### Цитометр # 1

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD8+	12	30.2	0.4	1.3

### Цитометр # 2

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD8+	12	29.4	1.1	3.9

## 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 нормы 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

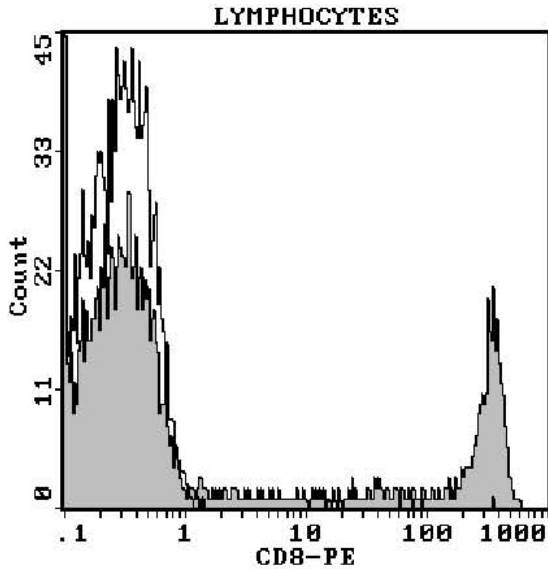
[www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)



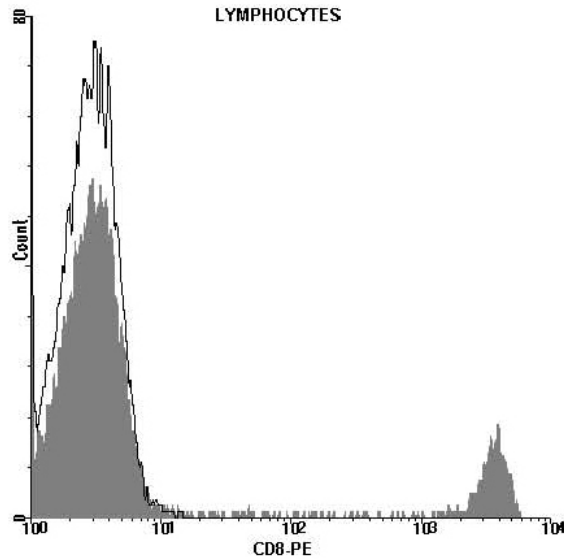
**ПРИМЕРЫ ДИАГРАММ**

Ниже показаны однопараметровые гистограммы (количество клеток – интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовались конъюгаты антител IOTest CD8-PE (кат. № A07757). Выполнялось выделение лимфоцитов программными средствами. Изотипический контроль (конъюгаты PE с мышинным IgG1, кат. № A07796) 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. Hannet, 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.
2. Alcover, A., "CD8 cluster report", 1995, Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens. Schlossman, S.F., et al., Eds., Oxford University Press, p. 353-354.
3. Clark, P., Normansell, D.E., Innes, D.J., Hess, C.E., "Lymphocyte subset in normal bone marrow", 1986, Blood, 6, 67, 1600-1606.
4. Baume, D.M., Caligiuri, M.A., Manley, T.J., Daley, J.F., Ritz, J., "Differential Expression of CD8a and CD8b Associated with MHC-Restricted and Non-MHC-Restricted Cytolytic Effector Cells", 1990, Cell. Immunol., 131, 352-365.
5. Moebius, U., Kober, G., Griscelli, A.L., Hercend, T., Meuer, S.C., "Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations", 1991, Eur. J. Immunol., 21, 1793-1800.
6. 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.
7. 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.
8. Bray, R.A., Gebel, H.M., "Applications of flow cytometry to transplantation of solid organs", 1990, Labmedica, Feb/March, 28-30.
9. 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 re-constitution phase after human bone marrow transplantation", 1988, Blood, 5, 71, 1196-1200.
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.