

IOtest®
CD25-PE

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07774

100 тестов; 2 мл

20 мкл / тест



IOtest
Конъюгаты антител

**ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO**



| Спецификации | |
|----------------|--|
| Специфичность | CD25 |
| Клон | B1.49.9 |
| Гибридома | NS1 x Balb/c |
| Иммуноген | Аллоактивированные Т-лимфоциты человека (FC2) |
| Иммуноглобулин | IgG2a |
| 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, BSA 2 мг/мл, 0.1% NaN ₃ |

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела используются для цитофлуориметрического анализа биологических образцов человека. Они позволяют идентифицировать клетки, экспрессирующие CD25, 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 CD25 считается маркером активации и дифференцировки (1).

Данный реагент позволяет охарактеризовать и подсчитать лейкоциты CD25⁺ (представленные, как правило, Т-лимфоцитами) при нарушениях иммунной системы (например, при иммунодефицитных состояниях и вирусных инфекциях) (2). Также он позволяет провести фенотипирование субпопуляций лейкоцитов CD25⁺ и наблюдение за пациентом при злокачественных заболеваниях крови (например, при волосовоклеточном лейкозе) (3 - 5).

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 азотистоводородную кислоту. При утилизации перед сливом в водопровод рекомендуется развести реагент большим объемом воды. Это позволит избежать накопления азидата 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: Мышиный IgG2a-PE.
- 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).

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител IOtest, а в пробирки для анализа контролей – рекомендованный объем 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. Ресуспенсируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.
9. Удалите супернатант аспирацией и ресуспенсируйте 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

Молекула CD25 исторически носит название "Тас-антиген" и представляет собой α -цепь рецептора интерлейкина 2 (IL-2R α), трансмембранный гликопротеин массой 55 кДа (6).

Высокоаффинный рецептор IL-2 составлен из трех цепей: α (IL-2R α , Тас, р55 или CD25), β (IL-2R β , р75 или CD122) и γ (IL-2R γ , р64 или CD132).

CD25 экспрессируется на циркулирующих CD4+ Т-лимфоцитах и не экспрессируется на CD8+ Т-лимфоцитах (7). Однако при активации все Т-лимфоциты экспрессируют CD25. Антиген CD25 экспрессируется на субпопуляции В-лимфоцитов CD20⁺. Циркулирующие гранулоциты, моноциты, естественные киллеры, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют молекулу CD25 (6).

В 1984 г. на Втором международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Бостоне, США, было подтверждено, что mAb B1.49.9 направлены против CD25 (WS Code: T141, Section T) (8).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны положительные клетки линии FEV 20.3 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 (%) |
|--------|--------------------|------------------------------|--------------|
| CD25 | Y = 0.99 X + 0.55 | 0.9996 | 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 было проведено исследование образцов 50 взрослых людей с использованием моноклональных антител B1.49.9 (к антигену CD25). В следующей таблице представлены результаты подсчета положительных событий:

| Лимфоциты | Количество образцов | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-----------|---------------------|-------------|------|--------|
| CD25+ | 50 | 10.88 | 5.12 | 47.08 |

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 (%) |
|-------------------------|----------------------|-------------|------|--------|
| CD25+ | 12 | 14.79 | 0.41 | 2.8 |

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Цитометр # 1

| Положительные лимфоциты | Количество измерений | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-------------------------|----------------------|-------------|------|--------|
| CD25+ | 12 | 14.79 | 0.41 | 2.8 |

Цитометр # 2

| Положительные лимфоциты | Количество измерений | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-------------------------|----------------------|-------------|------|--------|
| CD25+ | 12 | 12.63 | 0.29 | 2.3 |

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 5×10^9 /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.

ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER, EPICS 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



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotlán, B., Gyódi, E., Benczúr, K., Takács, T., Szabó, T., Troppmair, J., Onody, I., Petri, I., Kaiser, G., Kassai, M., Huber, C., Petrányi G.G., "The expression of activation markers and CD25 antigen on PBL in comparison with immune function after alloimmunization", 1987, in *Leukocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens*, McMichael, A.J., et al., Eds., Oxford Univ. Press, p. 534-536.
2. Borvak, J., Chou, C.S., Bell, K., Van Dyke, G., Zola, H., Ramilo, O., Vitetta, E.S., 1995, *J. of Immunol.*, "Expression of CD25 defines peripheral blood mononuclear cells with productive versus latent HIV infection", 155, 3196-3204.
3. Davis, B., H., Foucar, K., Szczarkowski, Ball, E., Witzig, T., Foon, K., A., Wells, D., Kotylo, P., Johnson, R., Hanson, C., and Bessman, D."U.S. – Canada Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematologic Neoplasia by Flow Cytometry: Medical Indication", 1997, *Cytometry*, 30 , 249-263.
4. Orfao, A., Ruiz-Arguelles, A., Lacombe, F., Ault, K., Basso, G., Danova, M. "Flow Cytometry: its application in hematology", 1995, *Heamatologica*, 80, 69-81.
5. Braylan, R.C., Orfao, A., Borowitz, M.J., Davis, B.H., 2001, *Cytometry*, "Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: Results of an international consensus meeting". 46, 23-27.
6. Sasaki, Y., Sugamura, K., "CD25 Workshop panel report", 1997, *Leucocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens*. Kishimoto, T., et al, Eds., Garland Publishing, Inc., 802-804.
7. Kaplan, D., "Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines", 1996, *Immunol. Today*, 7, 17, 303-304.
8. Haynes, B.F., "Summary of T cell studies performed during the second International Workshop and Conference on Human Leucocytes Differentiation Antigens", 1986, *Leucocyte Typing II, Human T lymphocytes*, Reinherz, E.L., et al. Eds., Springer-Verlag, 3-30.