



IOtest

Conjugated Antibody

CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 µL / test

TABLE OF CONTENTS

English	2
Français (FR)	5
Deutsch (DE)	8
Italiano (IT)	11
Español (ES)	14
Português Portugal (PT-PT)	17
Dansk (DA)	20
Svenska (SV)	23
Norsk (NO)	26
Ελληνικά (EL)	29
日本語 (JP)	32
Lietuviškai (LT)	35
Magyar (HU)	38
Polski (PL)	41
Čeština (CZ)	44
Slovenčina (SK)	47
한국어 (KO)	50
Türkçe (TR)	53
Русский (RU)	56
eesti keel (ET)	59
Hrvatski (HR)	62
Български (BG)	65
中文 (ZH-TW)	68
Română (RO)	71
Србија (SR)	74
Latviešu (LV)	77
Українська (UK)	80
Português Brasil (PT-BR)	83
APPENDIX	86
REFERENCES	87

	Specifications
Specificity	CD4
Clone	13B8.2
Hybridoma	NS1 x balb/c
Immunogen	Human thymocytes
Immunoglobulin	IgG1
Species	Mouse
Purification	Affinity Chromatography
Fluorochrom	R Phycoerythrin (PE)
Molar ratio	PE / Ig: 0.5 - 1.5
λ excitation	488 nm
Emission Peak	575 nm
Buffer	PBS pH 7.2 plus 2 mg / mL BSA and 0.1% NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD4-PE

[REF] A07751 100 tests; 2 mL, 20 μ L / test

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

This fluorochrome-conjugated antibody allows the identification and numeration of cell populations expressing the CD4 antigen present in human biological samples using flow cytometry.

PRINCIPLE

This test is based on the ability of specific monoclonal antibodies to bind to the antigenic determinants expressed by leucocytes.

Specific staining of the leucocytes is performed by incubating the sample with the IOTest reagent. The red cells are then removed by lysis and the leucocytes, which are unaffected by this process, are analyzed by flow cytometry.

The flow cytometer measures light diffusion and the fluorescence of cells. It makes possible the delimitation of the population of interest within the electronic window defined on a histogram, which correlates the orthogonal diffusion of light (Side Scatter or SS) and the diffusion of narrow-angle light (Forward Scatter or FS). Other histograms combining two of the different parameters available on the cytometer can be used as supports in the gating stage depending on the application chosen by the user.

The fluorescence of the delimited cells is analyzed in order to distinguish the positively-stained events from the unstained ones. The results are expressed as a percentage of positive events in relation to all the events acquired by the gating.

EXAMPLES OF CLINICAL APPLICATIONS

This reagent permits the characterization of CD4+ lymphocytic cell populations in immune system disorders: AIDS (1) and other immune deficiencies, autoimmune disorders (2), hypersensitivity reactions, viral infections, restoration of the immune response after bone marrow and/or organ transplantation. Follow-up and phenotyping of CD4+ cell populations (3) in malignant blood dyscrasias such as leukaemias and lymphomas.

REAGENTS

Concentration: See lot specific Certificate of Analysis at www.beckmancoulter.com.

WARNING AND PRECAUTIONS

1. Do not use the reagent beyond the expiry date.
2. Do not freeze.
3. Let it come to room temperature (18 – 25°C) before use.
4. Minimize exposure to light.
5. Avoid microbial contamination of the reagents, or false results may occur.
6. Antibody solutions containing sodium azide (NaN₃) should be handled with care. Do not take internally and avoid all contact with the skin, mucosa and eyes.

Moreover, in an acid medium, sodium azide can form the potentially dangerous hydrazoic acid. If it needs to be disposed of, it is recommended that the reagent be diluted in a large volume of water before pouring it into the drainage system so as to avoid the accumulation of sodium azide in metal pipes and to prevent the risk of explosion.

7. All blood samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care (in particular: the wearing of protective gloves, gowns and goggles).
8. Never pipet by mouth and avoid all contact of the samples with the skin, mucosa and eyes.
9. Blood tubes and disposable material used for handling should be disposed of in ad hoc containers intended for incineration.
10. Reagents and waste should be eliminated according to local requirements.

GHS HAZARD CLASSIFICATION

Not classified as hazardous



Safety Data Sheet is available at beckman.com/techdocs

STORAGE AND STABILITY

The conjugated liquid forms must be kept at between 2 and 8°C and protected from light, before and after the vial has been opened.

Stability of closed vial: see expiry date on vial.

Stability of opened vial: the reagent is stable for 180 days.

SAMPLES

Venous blood must be taken using sterile tubes containing an EDTA salt as the anticoagulant.

The samples should be kept at room temperature (18 – 25°C) and not shaken. The samples should be homogenized by gentle agitation prior to taking the test sample.

The samples must be analyzed within 24 hours of venipuncture.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any change in the physical appearance of the reagents may indicate deterioration and the reagent should not be used.

In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following e-mail address : immuno-techsup@beckmancoulter.com

CONTENTS

Sodium azide preservative may form explosive compounds in metal drain lines. See NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76).

To avoid the possible build-up of azide compounds, flush wastepipes with water after the disposal of undiluted reagent. Sodium azide disposal must be in accordance with appropriate local regulations.

MATERIALS NEEDED BUT NOT SUPPLIED WITH KIT:

- Sampling tubes and material necessary for sampling.
- Automatic pipettes with disposable tips for 20, 100 and 500 µL.
- Plastic haemolysis tubes.
- Red cell lysis reagent with washing stage after lysis. For example: VersaLyse (Ref. A09777).
- Leucocyte fixation reagent. For example : IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Isotypic control PE : IOTest reagent (Ref. A07796).
- Buffer (PBS: 0.01 M sodium phosphate; 0.145 M sodium chloride; pH 7.2).
- Centrifuge.
- Automatic agitator (Vortex type).
- Flow cytometer.

PROCEDURE WITH VERSALYSE REAGENT

Note: The procedure below is valid for standard applications. Sample and/or VersaLyse volumes for certain Beckman Coulter applications may be different. If such is the case, follow the instructions on the application's technical leaflet.

For each sample analyzed, in addition to the test tube, one control tube is required in which the cells are mixed in the presence of the isotypic control (Ref. A07796.).

1. Add 20 µL of specific IOTest conjugated antibody to each test tube, and 20 µL of the isotypic control to each control tube.
2. Add 100 µL of the test sample to both tubes. Vortex the tubes gently.
3. Incubate for 15 to 20 minutes at room temperature (18 – 25°C), protected from light.
4. Then perform lysis of the red cells, if necessary, by following the recommendations of the lysis reagent used. For example, if you wish to use VersaLyse (Ref. A09777), refer to the leaflet and follow preferably the procedure called "with concomitant fixation", which consists in adding 1 mL of the "Fix-and-Lyse" mixture prepared extemporaneously. Vortex immediately for one second and incubate for 10 minutes at room temperature, protected from light. If the sample does not contain red cells, add 2 mL of PBS.
5. Centrifuge for 5 minutes at 150 x g at room temperature.
6. Remove the supernatant by aspiration.
7. Resuspend the cell pellet using 3 mL of PBS.
8. Repeat step 5.
9. Remove the supernatant by aspiration and resuspend the cell pellet using:

0.5 mL or 1 mL of PBS plus 0.1% of formaldehyde if the preparations are to be kept less than 24 hours. (A 0.1% formaldehyde PBS can be obtained by diluting 12.5 µL of the IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) at its 10X concentration in 1 mL of PBS).

0.5 mL or 1 mL of PBS without formaldehyde, if the preparations are to be analyzed within 2 hours.

Note: In all cases, keep the preparations between 2 and 8°C and protected from light.

EXPECTED VALUES

Each laboratory must compile a list of reference values based upon a group of healthy donors from the local population. This must be done by taking age, sex and ethnic group into account, as well as any other potential regional differences.

In our laboratories, the whole blood samples of 50 healthy adults were treated using the reagent described above. The results obtained for the count of the positive events of interest with this reagent are given in the tables below :

Lymphocytes	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55.91	10.82	19.4

Monocytes	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90.86	4.97	5.47

PERFORMANCE

Performance data are obtained using the procedure described above on 24 hour-old blood samples previously collected on sterile tubes with EDTA salt as anticoagulant. Analysis is performed within 2 hours following immunostaining.

SPECIFICITY

The monoclonal antibody (mAb) 13B8.2 recognizes an epitope situated on the Ig-like V1 region of the CD4 antigen. A study of the epitopic map, using mutations targeting the extra-cytoplasmic regions of the molecule has shown that fixation of mAb 13B8.2 was only affected when the mutation involved the 88 and/or 89 residues (4). MAb 13B8.2 inhibits the in vitro fixation of HIV-1. MAb13B8.2 was assigned to CD4 during the 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, Oxford, England in 1986 (WS Code: 501, Section : T) (5).

INTRA-LABORATORY REPRODUCIBILITY

On the same day and using the same cytometer, 12 measurements of the percentage of staining of a positive target were carried out. The results obtained are summarized in the following table:

Positive Target	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
Lymphocytes +CD4-PE	12	37.84	0.80	2.1

Linearity

To test the linearity of staining of this reagent, a positive cell line (HPBALL) and a negative cell line (DAUDI) were mixed in different proportions with a constant final number of cells, so that the positive line/negative cell line ratio of the mixture ranged from 0 to 100%.

Aliquots were stained using the procedure described above and linear regression between the expected values and the observed values was calculated.

Specificity	Linear regression	Linearity (R ²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0.38$	0.9998

LIMITATIONS

- Flow cytometry may produce false results if the cytometer has not been aligned perfectly, if fluorescence leaks have not been correctly compensated for and if the regions have not been carefully positioned.
- It is preferable to use a RBC lysis technique with a washing step as this reagent has not been optimized for "no wash" lysis techniques.
- Accurate and reproducible results will be obtained as long as the procedures used are in accordance with the technical insert leaflet and compatible with good laboratory practices.
- The conjugated antibody of this reagent is calibrated so as to offer the best specific signal/non-specific signal ratio. Therefore, it is important to adhere to the reagent volume/sample volume ratio in every test.
- In the case of a hyperleucocytosis, dilute the blood in PBS so as to obtain a value of approximately 5×10^9 leucocytes/L (6).
- In certain disease states, such as severe renal failure or haemoglobinopathies, lysis of red cells may be slow, incomplete or even impossible. In this case, it is recommended to isolate mononucleated cells using a density gradient (Ficoll, for example) prior to staining (7).

See the Appendix for examples and references.

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

Symbols Key

Glossary of Symbols is available at beckman.com/techdocs (document number B60062)

	Spécifications
Spécificité	CD4
Clone	13B8.2
Hybridome	NS1 x balb/c
Immunogène	Human thymocytes
Immunoglobuline	IgG1
Espèce	Souris
Purification	Chromatographie d'affinité
Fluorochrome	R Phycoerythrin (PE)
Rapport molaire	PE/Ig : 0,5 - 1,5
Excitation λ	488 nm
Pic d'émission	575 nm
Solution tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/mL BSA et 0,1 % NaN ₃

IOTest

Anticorps conjugué

CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 µL/test

Pour une utilisation en Diagnostic *In Vitro*

UTILISATION

Cet anticorps conjugué à un fluorochrome permet l'identification et la numération des populations cellulaires exprimant l'antigène CD4 présentes dans des échantillons biologiques humains par cytométrie en flux.

PRINCIPE

Ce test est fondé sur la capacité d'anticorps monoclonaux spécifiques de se lier à des déterminants antigéniques exprimés par les leucocytes.

Une coloration spécifique des leucocytes est effectuée en incubant l'échantillon avec le réactif IOTest. Les globules rouges sont ensuite supprimés par lyses et les leucocytes, qui ne sont pas affectés par cette procédure, sont analysés par cytométrie en flux.

Le cytomètre en flux mesure la diffusion de la lumière et la fluorescence des cellules. Il rend possible la délimitation de la population d'intérêt au sein de la fenêtre électronique définie sur un histogramme, qui met en corrélation la diffusion orthogonale de la lumière (diffusion latérale ou SS) et la diffusion de la lumière en angle étroit (dispersion avant ou FS). D'autres histogrammes combinant deux des différents paramètres disponibles sur le cytomètre peuvent être utilisés comme supports dans la phase de gating en fonction de l'application choisie par l'utilisateur.

La fluorescence des cellules délimitées est analysée de manière à distinguer les événements colorés positifs de ceux qui ne le sont pas. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'événements positifs par rapport à tous les événements acquis grâce à la méthode de gating.

EXEMPLES D'APPLICATIONS CLINIQUES

Caractérisation des populations lymphocytaires CD4+ au cours de pathologies du système immunitaire : SIDA (1) et autres déficits immunitaires, maladies autoimmunes (2), hypersensibilité, infections virales, restauration immunitaire après greffe de moëlle et/ou d'organe. Suivi et phénotypage des populations lymphocytaires CD4+ (3) dans les hémopathies malignes telles que leucémies et lymphomes.

RÉACTIFS

Concentration : voir le certificat d'analyse spécifique du lot sur www.beckmancoulter.com.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date de péremption.
2. Ne pas congeler.
3. Laisser le réactif passer à la température ambiante (18–25 °C) avant de l'utiliser.
4. Minimiser l'exposition à la lumière.
5. Éviter la contamination microbienne des réactifs, ou des résultats erronés peuvent se produire.
6. Les solutions d'anticorps contenant de l'azide de sodium (NaN₃) doivent être manipulées avec précautions. Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux.

En outre, dans un milieu acide, l'azoture de sodium peut former le potentiellement dangereux acide hydrazoïque. S'il doit être éliminé, il est recommandé de diluer le réactif dans un grand volume d'eau avant de le verser dans le système de drainage afin d'éviter l'accumulation d'azoture de sodium dans les tubes métalliques et de prévenir le risque d'explosion.

7. Tous les échantillons de sang doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés avec soin (en particulier : port de gants, de blouses et de lunettes de protection).
8. Ne jamais pipeter à la bouche et éviter tout contact des échantillons avec la peau, les muqueuses et les yeux.
9. Les tubes de prélèvement sanguin et les matériaux jetables utilisés pour la manipulation doivent être éliminés dans des conteneurs appropriés prévus pour incinération.
10. Les réactifs et les déchets doivent être éliminés conformément aux exigences locales.

CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

Non classifié comme dangereux



La fiche technique santé-sécurité est disponible à l'adresse techdocs.beckman.com

CONSERVATION ET STABILITÉ

Les conjugués sous forme liquide doivent être conservés entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière, avant et après ouverture du flacon.

Stabilité du flacon fermé : voir la date de péremption sur le flacon.

Stabilité du flacon ouvert : le réactif est stable pendant 180 jours.

ÉCHANTILLONS

Le sang veineux doit être prélevé avec des tubes stériles contenant un sel EDTA comme anticoagulant.

Les échantillons doivent être conservés à température ambiante (18–25 °C) et ne doivent pas être agités. Les échantillons doivent être homogénéisés par agitation douce avant de prélever l'échantillon de test.

Les échantillons doivent être analysés dans les 24 heures qui suivent la ponction veineuse.

PREUVE DE DÉTÉRIORATION

Tout changement de l'apparence physique des réactifs peut indiquer une détérioration et le réactif ne doit pas être utilisé.

En cas de détérioration de l'emballage ou si les données obtenues indiquent certaines altérations des performances, veuillez contacter notre service Support Technique : 04 91 17 27 27 Fax : 04 91 17 27 25 immuno-techsup@beckmancoulter.com

CONTENU

Les agents de conservation à base d'azoture de sodium peuvent former des composés explosifs dans les conduites d'évacuation métalliques. Voir le bulletin NIOSH : Explosive Azide Hazard (16/8/76) (Dangers d'explosion de l'azide).

Pour éviter l'accumulation potentielle des composés d'azoture, rincer les tuyaux d'évacuation à l'eau après l'élimination de réactifs non dilués. L'élimination de l'azoture de sodium doit se faire conformément aux réglementations locales en vigueur.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI AVEC CE COFFRET:

- Les tubes d'échantillonnage et le matériel nécessaires pour l'échantillonnage.
- pipettes automatiques aux embouts jetables pour 20, 100 et 500 µL.
- Tubes d'hémolyse en plastique.
- Réactif de lyse des érythrocytes avec étape de lavage post-lyse. Par exemple : VersaLyse (Réf. A09777).
- Réactif de fixation de leucocyte. Par exemple : Solution fixative IOTest 3 (Réf. A07800).
- Contrôle isotypique PE : réactif IOTest (Réf. A07796.).
- Tampon (PBS : 0,01 M phosphate de sodium ; 0,145 M chlorure de sodium ; pH 7,2).
- Centrifugeuse.
- Agitateur automatique (type vortex).
- Cytomètre en flux.

PROCÉDURE AVEC RÉACTIF VERSALYSE

Nota Bene : La procédure ci-dessous est valable pour des applications standard. Les volumes d'échantillon et/ou de VersaLyse pour certaines applications Beckman Coulter peuvent être différents. Si tel est le cas, suivre les instructions de la fiche technique de l'application.

Pour chaque échantillon analysé, prévoir en plus du tube test, un tube contrôle dans lequel les cellules seront mises en présence du contrôle isotypique (Réf. A07796.).

1. Ajouter 20 µL d'anticorps conjugué spécifique IOTest à chaque tube test et 20 µL de contrôle isotypique dans chaque tube de contrôle.
2. Ajouter 100 µL de l'échantillon à tester dans les 2 tubes. Vortexer doucement.
3. Incuber pendant 15 à 20 minutes à température ambiante (18–25 °C), à l'abri de la lumière.
4. Procéder, si nécessaire, à la lyse des globules rouges en suivant les recommandations du réactif de lyse utilisé. A titre d'exemple, si l'on souhaite utiliser VersaLyse (Réf. A09777), se reporter à la notice et suivre de préférence la procédure dite « avec fixation concomitante » qui consiste à ajouter 1 mL du mélange "Fix-and-Lyse" préparé extemporanément. Vortexer immédiatement pendant une seconde et incuber 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Si l'échantillon ne contient pas de globules rouges, ajouter 2 mL de PBS.
5. Centrifuger pendant 5 minutes à 150 x g à température ambiante.
6. Retirer le surnageant par aspiration.
7. Remettre le culot cellulaire en suspension en utilisant 3 mL de PBS.
8. Répéter l'étape 5.
9. Éliminer le liquide surnageant par aspiration et remettre le culot cellulaire en suspension en utilisant :
0,5 mL ou 1 mL de PBS plus 0,1 % de formaldéhyde si les préparations doivent être conservées moins de 24 heures. (Un PBS avec 0,1 % de formaldéhyde peut être obtenu en diluant 12,5 µL de la solution de fixation IOTest 3 (REF A07800) car c'est sa concentration 10x dans 1 mL de PBS).
0,5 mL ou 1 mL de PBS sans formaldéhyde, si les préparations doivent être conservées dans les 2 heures.

Remarque : dans tous les cas, conserver les préparations entre 2 et 8 °C et à l'abri de la lumière.

VALEURS ATTENDUES

Chaque laboratoire doit établir une liste de valeurs de référence basée sur un groupe de donneurs sains appartenant à la population locale. Ceci doit être fait en tenant compte de l'âge, du sexe, de l'appartenance ethnique, ainsi que de toute autre différence régionale potentielle.

Dans nos laboratoires, le sang total de 50 adultes sains a été traité en utilisant le réactif décrit ci-dessus. Les résultats obtenus pour la numération des événements d'intérêt positifs avec ce réactif sont regroupés dans les tableaux ci-après :

Lymphocytes	Nombre	Moyenne (%)	ET (Écart type)	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocytes	Nombre	Moyenne (%)	ET (Écart type)	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

PERFORMANCE

Les données de performance sont obtenues suivant la procédure décrite précédemment sur des échantillons de sang âgé de 24 heures collecté auparavant dans des tubes stériles avec du sel d'EDTA comme anticoagulant. L'analyse est réalisée dans les 2 heures qui suivent l'immunomarquage.

SPÉCIFICITÉ

L'anticorps monoclonal (AcM) 13B8.2 reconnaît un épitope situé sur la région V1 de la structure immunoglobulinique ("Ig-like") de l'antigène CD4. Une étude de la carte épitopique au moyen de mutations ciblant les régions extra-cytoplasmiques de la molécule a montré que la fixation de l'anticorps 13B8.2 n'était affectée que lorsque la mutation touchait les résidus 88 et/ou 89 (4). L'AcM 13B8.2 inhibe in vitro la fixation du VIH-1. L'AcM 13B8.2 a été assigné au CD4 au cours du 3ème HLDA Workshop sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains, d'Oxford, Angleterre, en 1986 (WS Code : 501, Section : T) (5).

REPRODUCTIBILITE INTRA-LABORATOIRE

Le même jour et sur le même cytomètre, 12 déterminations du pourcentage de marquage d'une cible positive ont été menées. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Cible positive	Nombre	Moyenne (%)	ET (Écart type)	CV (%)
Lymphocytes CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linéarité

Pour tester la linéarité du marquage de ce réactif, une lignée cellulaire positive ((HPBALL)) et une lignée cellulaire négative ((DAUDI)) ont été mélangées en différentes proportions et à quantité cellulaire finale constante, de manière à ce que le rapport lignée positive / lignée négative du mélange s'échelonne de 0 à 100 %.

Des aliquotes ont été marquées selon la procédure décrite ci-dessus et la régression linéaire entre valeurs attendues et valeurs observées a été calculée.

Spécificité	Régression linéaire	Linéarité (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

LIMITES

1. La cytométrie en flux peut produire des résultats erronés si le cytomètre n'a pas été parfaitement aligné, si les fuites de fluorescence n'ont pas été correctement compensées et si les régions n'ont pas été soigneusement positionnées.
2. Utiliser de préférence une technique de lyse des globules rouges avec lavage car ce réactif n'a pas été optimisé pour les techniques de lyse dites "sans lavage".
3. Des résultats précis et reproductibles seront obtenus tant que les procédures utilisées sont en conformité avec la notice technique et compatibles avec les bonnes pratiques de laboratoire.
4. L'anticorps conjugué de ce réactif est étalonné de manière à offrir le meilleur ratio de signal spécifique/signal non spécifique. Par conséquent, il est important de respecter le ratio de volume de réactif/volume d'échantillon à chaque test.
5. En cas d'hyperleucocytose, diluer le sang dans du PBS de façon à obtenir une valeur d'approximativement 5×10^9 leucocytes/L (6).
6. Dans certains états pathologiques, tels qu'une grave insuffisance rénale ou une hémoglobinopathie, la lyse des globules rouges peut être lente, incomplète ou même impossible. Dans ce cas, il est recommandé d'isoler les cellules mononucléées à l'aide d'un gradient de densité (Ficoll, par exemple) avant la coloration (7).

Voir l'annexe pour des exemples et des références.

MARQUES

Beckman Coulter, le logo stylisé et les marques des produits et des services Beckman Coulter mentionnées ici sont des marques ou des marques déposées de Beckman Coulter, Inc. aux États-Unis et dans d'autres pays.

Légende des symboles

Un glossaire des symboles est disponible sur beckmancoulter.com/techdocs (document numéro B60062)

	Spezifikationen
Spezifität	CD4
Klon	13B8.2
Hybridom	NS1 x balb/c
Immunogen	Human thymocytes
Immunglobulin	IgG1
Spezies	Maus
Aufreinigung	Affinitätschromatografie
Fluorochrom	R Phycoerythrin (PE)
Molverhältnis	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ -Anregung	488 nm
Emissionspeak	575 nm
Puffer	PBS pH 7,2 plus 2 mg/mL BSA und 0,1 % NaN ₃

IOTest Konjugierter Antikörper CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 µL/Test

Zur Verwendung als *In vitro*-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Dieser mit einem Fluorochrom konjugierte Antikörper dient zur Identifikation und Zählung im Durchflusszytometer von CD4-Antigen exprimierenden Zellpopulationen in menschlichen biologischen Proben.

PRINZIP

Dieser Test basiert auf der Fähigkeit bestimmter monoklonaler Antikörper, an die durch Leukozyten exprimierten antigenen Determinanten zu binden.

Die spezifische Färbung der Leukozyten erfolgt durch Inkubation der Probe mit dem IOTest-Reagenz. Die Erythrozyten können dann mittels Lyse entfernt werden. Die von diesem Vorgang unberührten Leukozyten werden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Das Durchflusszytometer misst die Lichtstreuung und die Fluoreszenz der Zellen. Es ermöglicht die Abgrenzung der gewünschten Population innerhalb des auf einem Histogramm definierten elektronischen Fensters, welches die orthogonale Lichtstreuung (Seitwärtsstreuung, SW) und die Streuung des Lichts im flachen Winkel (Vorwärtsstreuung, VW) in Beziehung zueinander setzt. Andere Histogramme, die zwei der auf dem Zytometer verfügbaren Parameter kombinieren, können zur Unterstützung beim Gating eingesetzt werden, je nachdem welche Anwendung der Benutzer ausgewählt hat.

Die Fluoreszenz der einzelnen Zellen wird analysiert, um die positiv angefärbten Ereignisse von den nicht angefärbten zu unterscheiden. Die Ergebnisse werden als Prozentsatz positiver Ereignisse relativ zu allen durch das Gating erfassten Ereignissen angegeben.

BEISPIELE KLINISCHER ANWENDUNGEN

Dieses Reagenz ermöglicht die Charakterisierung von lymphozytären Zellpopulationen des Typs CD4+ bei Erkrankungen des Immunsystems: AIDS (1) und andere Immundefekte, Autoimmunerkrankungen (2), Überempfindlichkeitsreaktionen, Virusinfektionen, Wiederherstellung der Immunreaktion nach einer Knochenmark- oder Organtransplantation. Nachuntersuchung und Phänotypisierung von Zellpopulationen des Typs CD4+ (3) bei maligner Blutdyskrasie wie Leukämie oder Lymphomen.

REAGENZIEN

Konzentration: Siehe chargenspezifisches Analysezertifikat unter www.beckmancoulter.com.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Das Reagenz nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.
2. Nicht einfrieren.
3. Vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18–25 °C) bringen.
4. Vor Licht schützen.
5. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, damit kein falsches Ergebnis erzielt wird.
6. Antikörperlösungen, die Natriumazid (NaN₃) enthalten, vorsichtig handhaben. Nicht einnehmen und Berührungen mit Haut, Schleimhäuten und Augen vermeiden.
Zudem kann Natriumazid in einem sauren Medium zur Bildung potenziell gefährlicher Stickstoffwasserstoffsäure führen. Zur Entsorgung des Reagenzes wird empfohlen, das Reagenz mit viel Wasser zu verdünnen, bevor es in das Abwassersystem gegossen wird, um einer Ansammlung von Natriumazid in den Metallrohren und dem Risiko einer Explosion vorzubeugen.
7. Blutproben sind als potenziell infektiös zu betrachten und müssen mit Vorsicht gehandhabt werden (insbesondere durch Tragen von Schutzhandschuhen, -kittel und -brille).
8. Nie mit dem Mund pipettieren und jeglichen Kontakt der Proben mit der Haut, den Schleimhäuten und den Augen vermeiden.
9. Blutröhrchen und Einwegmaterial, das zur Handhabung verwendet wird, müssen in dafür vorgesehenen, für die Verbrennung bestimmten Behältern entsorgt werden.
10. Reagenzien und Abfälle sind entsprechend den örtlichen Anforderungen zu entsorgen.

GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Nicht als gefährlich eingestuft

LAGERUNG UND STABILITÄT

Die flüssigen konjugierten Formen werden vor und nach Öffnen des Fläschchens bei 2 bis 8 °C vor Lichteinstrahlung geschützt aufbewahrt.

Stabilität geschlossener Fläschchen: siehe Verfallsdatum auf dem Fläschchen.

Stabilität geöffneter Fläschchen: Das Reagenz ist 180 Tage lang stabil.

PROBEN

Venöses Blut muss mit sterilen Röhrchen entnommen werden, die ein EDTA-Salz als Antikoagulant enthalten.

Die Proben bei Raumtemperatur (18–25 °C) aufbewahren und nicht schütteln. Die Proben vor Entnahme der Testprobe durch vorsichtiges Schütteln homogenisieren.

Die Proben müssen innerhalb von 24 Stunden analysiert werden.

VERFALLSANZEICHEN

Ein verändertes Aussehen der Reagenzien kann ein Verfallsanzeichen sein. Entsprechende Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.

Wenn die Verpackung beschädigt ist oder die erhaltenen Daten irgendwelche Leistungsänderungen anzeigen, kontaktieren Sie Ihren lokalen Vertriebshändler oder wenden sich an folgende E-Mail-Adresse: immuno-techsup@beckmancoulter.com

INHALT

Natriumazid als Konservierungsmittel kann in metallischen Abflussleitungen explosive Verbindungen bilden. Siehe NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (16.8.76) (NIOSH-Bulletin: Gefahr durch explosive Azide).

Um eine mögliche Akkumulation von Azidverbindungen zu vermeiden, die Abwasserrohre nach der Entsorgung von unverdünntem Reagenz mit Wasser spülen. Natriumazid muss entsprechend den örtlichen behördlichen Vorschriften entsorgt werden.

BENÖTIGTE, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENE ARTIKEL:

- Probenahmeröhrchen und für die Probenahme benötigte Materialien.
- Automatische Pipetten mit Einwegspritzen für 20, 100 und 500 µL.
- Hämolyseröhrchen aus Kunststoff.
- Reagenz zur Lyse der Erythrozyten mit Waschstufe nach der Lyse. Beispiel: VersaLyse (Ref. A09777).
- Reagenz zur Leukozytenfixierung. Beispiel: IOTest 3-Fixierungslösung (Ref. A07800).
- Isotypiekontrolle PE : IOTest-Reagenz (Art. A07796.).
- Puffer (PBS: 0,01 M Natriumphosphat; 0,145 M Natriumchlorid; pH 7,2).
- Zentrifuge.
- Automatisches Mischgerät (Typ Vortex-Mischer).
- Durchflussszytometer.

VERFAHREN MIT VERSALYSE-REAGENZ

HINWEIS: Das nachfolgende Verfahren gilt für Standardanwendungen. Die Probe- und/oder VersaLyse-Mengen können bei einigen Beckman Coulter-Anwendungen abweichen. In diesem Fall sind die Anleitungen des technischen Datenblatts der Anwendung zu befolgen.

Für jede getestete Probe zusätzlich zum Teströhrchen ein Kontrollröhrchen vorsehen, in dem die Zellen mit der Isotypiekontrolle in Kontakt gebracht werden (Art. A07796.).

1. 20 µL des spezifischen, konjugierten IOTest-Antikörpers in jedes Teströhrchen und 20 µL der Isotypkontrolle in jedes Kontrollröhrchen geben.
2. In beiden Röhrchen 100 µL der zu testenden Probe hinzufügen. Leicht rütteln (Vortex).
3. Bei Raumtemperatur (18–25 °C) 15 bis 20 Minuten lang lichtgeschützt inkubieren.
4. Falls erforderlich eine Erythrolyse durchführen und dabei die Anleitungen des angewendeten Lyse-Reagenzes befolgen. Wenn Sie z. B. VersaLyse (Art. A09777) verwenden möchten, sollten Sie sich nach der Anleitung richten und am besten das Verfahren "mit gleichzeitiger Fixation" anwenden, das darin besteht 1 mL der frisch zubereiteten "Fix-and-Lyse"-Mischung hinzufügen. Sofort eine Sekunde lang rütteln und 10 Minuten bei Raumtemperatur und vor Lichteinstrahlung geschützt inkubieren. Wenn die Probe keine roten Blutkörperchen enthält, 2 mL PBS hinzufügen.
5. Bei 150 x g 5 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugieren.
6. Den Überstand absaugen.
7. Das Zellpellet in 3 mL PBS resuspendieren.
8. Schritt 5 wiederholen.
9. Den Überstand absaugen und das Zellpellet resuspendieren mit:
0,5 mL oder 1 mL PBS plus 0,1 % Formaldehyd, wenn die Präparate weniger als 24 Stunden erhalten werden sollen. (0,1 % Formaldehyd-PBS kann durch Verdünnen von 12,5 µL der IOTest 3-Fixierungslösung (REF A07800) bei 10 x Konzentration in 1 mL PBS erhalten werden.)
0,5 mL oder 1 mL PBS ohne Formaldehyd, wenn die Präparate innerhalb von weniger als 2 Stunden analysiert werden sollen.

Hinweis: Die Präparate in jedem Fall zwischen 2 und 8 °C und vor Licht geschützt aufbewahren.

ERWARTETE WERTE

Jedes Labor muss eine Liste von Referenzwerten erstellen, die auf einer Gruppe von gesunden Spendern aus der lokalen Population beruht. Dies hat unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, ethnischer Zugehörigkeit sowie allen anderen potentiellen regionalen Unterschieden zu erfolgen.

In unseren Laboren wurde Vollblut von 50 gesunden Erwachsenen unter Anwendung des oben beschriebenen Reagenzes behandelt. Die mit diesem Reagenz für die Zählung der relevanten positiven Ereignisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst :

Lymphozyten	Nummer	Mittelwert (%)	SD	VK (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monozyten	Nummer	Mittelwert (%)	SD	VK (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

LEISTUNG

Die Leistungsdaten wurden mit der oben beschriebenen Prozedur aus 24 h alten Blutproben ermittelt, die in sterilen Röhrchen mit EDTA-Salz als Antigerinnungsmittel gesammelt wurden. Die Analyse wird innerhalb von 2 Stunden nach dem Immunostaining durchgeführt.

SPEZIFITÄT

Der monoklonale Antikörper (mAk) 13B8.2 erkennt ein auf der Region V1 der Immunglobulinstruktur ("Ig-like") des Antigens CD4 gelegenes Epitop. Eine Studie mittels Mutationen an den extrazytoplasmatischen Regionen des Moleküls hat gezeigt, dass die Fixation des Antikörpers 13B8.2 nur beeinträchtigt war, wenn die Mutation die Rückstände 88 und/oder 89 betraf (4). Der mAk 13B8.2 inhibiert in vitro die Fixation des HIV-1. Der mAk 13B8.2 wurde 1986 auf dem 3. HLDA-Workshop über die Differenzierungsantigene der menschlichen Leukozyten in Oxford (England) (WS Code: 501, Sektion T) (5) dem Molekül CD4 zugeordnet.

REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES LABORS

Am gleichen Tag und am gleichen Zytometer wurden 12 prozentuale Analysen der Markierung eines Positiv-Targets durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Positives Ziel	Nummer	Mittelwert (%)	SD	VK (%)
Lymphozyten CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearität

Zum Testen der Markierungslinearität dieses Reagenzes wurden eine positive ((HPBALL)) und eine negative ((DAUDI)) Zellpopulation in unterschiedlichen Proportionen, jedoch bei gleichbleibender endgültiger Zellmenge vermischt, so dass sich das Verhältnis zwischen positiver und negativer Population der Mischung zwischen 0 und 100 % bewegt.

Es wurden gemäß dem vorausgehend beschriebenen Verfahren Aliquote markiert und die lineare Regression zwischen den erwarteten und beobachteten Werten berechnet.

Spezifität	Lineare Regression	Linearität (R2)
CD4-PE	Y = 1 X - 0,38	0,9998

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die Durchflusszytometrie kann falsche Ergebnisse liefern, wenn das Zytometer nicht perfekt ausgerichtet wurde, wenn Fluoreszenzlecks nicht korrekt kompensiert wurden und wenn die Bereiche nicht sorgfältig positioniert wurden.
- Vorzugsweise sollte eine Lysetechnik der Erythrozyten mit Waschschritten angewendet werden, da dieses Reagenz nicht für Lysetechniken ohne Waschschrte optimiert wurde.
- Genaue und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, sofern die verwendeten Verfahren der technischen Packungsbeilage entsprechen und mit der guten Laborpraxis kompatibel sind.
- Der konjugierte Antikörper dieses Reagenzes ist so kalibriert, dass er das beste Verhältnis von spezifischem zu unspezifischem Signal bietet. Daher ist es wichtig, das Verhältnis Reagenzvolumen/Probenvolumen bei jedem Test einzuhalten.
- Im Falle einer Hyperleukozytose das Blut in PBS verdünnen, um einen Wert von ungefähr 5 x 10⁹ Leukozyten/L zu erhalten(6).
- Bei bestimmten Krankheitszuständen, beispielsweise einem schweren Nierenversagen oder Hämoglobinopathien, kann die Lyse der Erythrozyten möglicherweise nur langsam oder unvollständig erfolgen oder sogar unmöglich sein. In diesem Fall empfiehlt es sich, vor dem Färben einkernige Zellen mittels eines Dichtegradienten (beispielsweise Ficoll) zu isolieren (7).

Beispiele und Literaturhinweise siehe Anhang.

MARKEN

Beckman Coulter, das stilisierte Logo und die in diesem Dokument erwähnten Beckman Coulter-Produkt- und Dienstleistungsmarken sind in den USA und anderen Ländern Marken oder eingetragene Marken von Beckman Coulter, Inc.

Liste der Symbole

Das Glossar der Symbole ist auf beckman.com/techdocs (Dokumentnummer B60062) verfügbar.



	Specifiche
Specificità	CD4
Clone	13B8.2
Ibridoma	NS1 x balb/c
Immunogeno	Human thymocytes
Immunoglobulina	IgG1
Specie	Topo
Purificazione	Cromatografia di affinità
Fluorocromo	R Phycoerythrin (PE)
Rapporto molare	PE / Ig: 0,5 - 1,5
Eccitazione λ	488 nm
Picco di emissione	575 nm
Tampone	PBS pH 7,2 più 2 mg/mL di BSA e NaN ₃ 0,1%

IOTest

Anticorpo coniugato CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 µL/test

Per uso diagnostico *in vitro*

USO PREVISTO

Questo anticorpo coniugato a un fluorocromo consente l'identificazione e la numerazione delle popolazioni cellulari che esprimono l'antigene CD4, presenti nei campioni biologici umani analizzati in citometria a flusso.

PRINCIPIO

Questo test si basa sulla capacità di specifici anticorpi monoclonali di legarsi ai determinanti antigenici espressi dai leucociti.

La colorazione specifica dei leucociti viene eseguita incubando il campione con il reagente IOTest. Gli eritrociti vengono quindi rimossi tramite lisi e i leucociti, non interessati da questo processo, vengono analizzati tramite citometria a flusso.

Il citometro a flusso misura la diffusione di luce e la fluorescenza delle cellule. Ciò consente la delimitazione della popolazione di interesse con la finestra elettronica definita in un istogramma, che correla la diffusione ortogonale della luce (scattering laterale o SS) e la diffusione della luce ad angolo stretto (scattering frontale o FS). Altri istogrammi che combinano due dei diversi parametri disponibili sul citometro possono essere usati come supporti nella fase di determinazione del gate in base alle applicazioni scelte dall'utente.

La fluorescenza delle cellule delimitate viene analizzata per distinguere gli eventi colorati in modo positivo e quelli non colorati. I risultati sono espressi come percentuale di eventi positivi in relazione a tutti gli eventi acquisiti mediante determinazione del gate.

ESEMPI DI APPLICAZIONI CLINICHE

Caratterizzazione delle popolazioni linfocitarie CD4+ nel corso di determinate patologie del sistema immunitario: AIDS (1) e altri deficit immunitari, malattie autoimmuni (2), ipersensibilità, infezioni virali, ripresa del sistema immunitario dopo trapianti di midollo e/o d'organo. Monitoraggio e fenotipizzazione delle popolazioni linfocitarie CD4+ (3) nelle emopatie maligne quali le leucemie e i linfomi.

REAGENTI

Concentrazione: vedere il certificato di analisi specifico per il lotto su www.beckmancoulter.com.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza.
2. Non congelare.
3. Prima dell'uso, portare a temperatura ambiente (18-25 °C).
4. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce.
5. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti, poiché potrebbe falsare i risultati.
6. Le soluzioni di anticorpi che contengono sodio azide (NaN₃) devono essere maneggiate con cura. Non ingerire ed evitare qualsiasi contatto con cute, mucose e occhi.

Inoltre, in un mezzo acido, il sodio azide può formare acido idrazoico, che è potenzialmente pericoloso. Per lo smaltimento, si consiglia di diluire il reagente in un grande volume di acqua prima di versarlo nell'impianto di scarico, in modo da evitare l'accumulo di sodio azide nelle tubazioni metalliche ed evitare il rischio di esplosione.
7. Tutti i campioni di sangue devono essere considerati potenzialmente infetti e devono essere maneggiati con cura (in particolare, indossando guanti, camici e occhiali protettivi).
8. Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto dei campioni con la pelle, le mucose e gli occhi.
9. Le provette per il sangue e i materiali monouso usati per la manipolazione devono essere smaltiti in appositi contenitori destinati all'inceneritore.
10. I reagenti e i rifiuti devono essere smaltiti conformemente alla normative locali.

CLASSIFICAZIONE DEI PERICOLI GHS

Classificato come non pericoloso



La scheda tecnica sulla sicurezza è disponibile all'indirizzo beckman.com/techdocs

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Le forme liquide coniugate devono essere conservate a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C e al riparo dalla luce, prima e dopo l'apertura della fiala.

Stabilità di una fiala chiusa: vedere la data di scadenza sulla fiala.

Stabilità di una fiala aperta: il reagente è stabile per 180 giorni.

CAMPIONI

I campioni di sangue venoso devono essere prelevati utilizzando provette sterili contenenti un sale EDTA come anticoagulante.

I campioni devono essere conservati a temperatura ambiente (18-25 °C) e non devono essere agitati. I campioni devono essere omogeneizzati agitandoli con delicatezza prima di prelevare il campione per il test.

I campioni devono essere analizzati entro 24 ore dalla venipuntura.

INDICI DI DETERIORAMENTO

Qualsiasi cambiamento dell'aspetto fisico dei reagenti può indicare un deterioramento. In tale caso, non utilizzare il reagente.

In caso di deterioramento dell'imballaggio o se i dati ottenuti presentano alcune alterazioni nelle prestazioni, rivolgersi al distributore locale o inviare un'e-mail al seguente indirizzo:

SOMMARIO

Il conservante sodio azide può formare composti esplosivi nelle tubazioni metalliche di scarico. Vedere il bollettino NIOSH: Explosive Azide Hazard (16/8/76) (Bollettino dell'Istituto Nazionale per la Sicurezza e la Salute sul Lavoro: Rischio di esplosione del sodio azide).

Per evitare il possibile accumulo di azidi, lavare i tubi di scarico con acqua dopo lo smaltimento del reagente puro. Il sodio azide deve essere eliminato conformemente alle normative locali applicabili.

COMPONENTI NECESSARI MA NON FORNITI CON IL KIT:

- Provette per campioni e materiale necessario per il campionamento.
- Pipette automatiche con punte monouso per 20, 100 e 500 µL.
- Provette per emolisi in plastica.
- Reagente per lisi degli eritrociti con fase di lavaggio successiva alla lisi. Ad esempio: VersaLyse (Rif. A09777).
- Reagente di fissaggio dei leucociti. Ad esempio: Soluzione fissante IOTest 3 (Rif. A07800).
- Controllo isotipico PE : reagente IOTest (Rif. A07796.).
- Tampone (PBS: 0,01 M di fosfato di sodio, 0,145 M di cloruro di sodio, pH 7,2).
- Centrifugare.
- Agitatore automatico (tipo Vortex).
- Citometro a flusso.

PROCEDURA CON REAGENTE VERSALYSE

N.B.: La procedura seguente è valida per delle applicazioni standard. I volumi di campione e/o di VersaLyse per certe applicazioni Beckman Coulter possono essere diversi. In questo caso, seguire le istruzioni della scheda tecnica di applicazione.

Per ogni campione analizzato, è necessario prevedere, oltre alla provetta test, 1 provetta di controllo nella quale saranno messe le cellule in presenza del controllo isotipico (Rif. A07796.).

1. Aggiungere 20 µL di anticorpi coniugati IOTest in ciascuna provetta e 20 µL di controllo isotipico in ciascuna provetta di controllo.
2. Aggiungere 100 µL del campione da testare nelle 2 provette. Agitare delicatamente nell'agitatore.
3. Incubare a temperatura ambiente (18-25 °C) per 15-20 minuti, al riparo dalla luce.
4. Se necessario, procedere alla lisi dei globuli rossi attenendosi alle raccomandazioni del reagente di lisi utilizzato. A titolo di esempio, qualora si desiderasse utilizzare VersaLyse (Rif. A09777), vedere la scheda tecnica e seguire preferibilmente la procedura « con fissaggio concomitante » che consiste nell'aggiungere 1 mL di una miscela di "Fix-and-Lyse", preparata estemporaneamente. Agitare immediatamente al Vortex per un secondo e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Se il campione non contiene globuli rossi, aggiungere 2 mL di PBS.
5. Centrifugare per 5 minuti a 150 x g a temperatura ambiente.
6. Rimuovere il surnatante mediante aspirazione.
7. Risospendere il pellet cellulare utilizzando 3 mL di PBS.
8. Ripetere il passaggio 5.
9. Eliminare il surnatante tramite aspirazione e risospendere il pellet cellulare tramite:

0,5 mL o 1 mL di PBS più 0,1% di formaldeide, se i preparati devono essere conservati meno di 24 ore. (È possibile ottenere PBS con formaldeide allo 0,1% diluendo 12,5 µL di soluzione fissante IOTest 3 (REF A07800) alla concentrazione di 10x in 1 mL di PBS).

0,5 mL o 1 mL di PBS senza formaldeide, se i preparati devono essere analizzati entro 2 ore.

Nota: in tutti i casi, mantenere i preparati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C, al riparo dalla luce.

VALORI ATTESI

Ogni laboratorio deve redigere un elenco di valori di riferimento basato su un gruppo di donatori sani appartenenti alla popolazione locale. Ciò deve essere fatto tenendo conto dell'età, del sesso, dell'appartenenza etnica e di qualsiasi altra potenziale differenza regionale.

Nei nostri laboratori, sono stati analizzati i campioni di sangue intero di 50 soggetti adulti sani utilizzando il reagente sopra descritto. Nelle seguenti tabelle sono riportati i risultati ottenuti con questo reagente per la numerazione dei casi risultati positivi :

Linfociti	Numero	Media (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

No Translation Available	Numero	Media (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

PRESTAZIONI

I dati relativi alla performance sono ottenuti utilizzando la procedura sopra descritta su campioni di sangue raccolti da 24 ore in provette sterili, utilizzando un sale di EDTA come anticoagulante. L'analisi è effettuata entro le 2 ore successive all'immunostaining.

SPECIFICITÀ

L'anticorpo monoclonale (MoAb) 13B8.2 riconosce un epitopo localizzato sul dominio V1 della struttura immunoglobulinica ("Ig-like") dell'antigene CD4. Uno studio degli epitopi mediante analisi delle mutazioni localizzate nei domini extra-citoplasmatici della molecola ha dimostrato che il legame dell'anticorpo 13B8.2 era alterato solo quando la mutazione interessava i residui 88 e/o 89 (4). Il MoAb 13B8.2 inibisce il legame dell'HIV-1 in vitro. Il MoAb 13B8.2 è stato riconosciuto come specifico per l'antigene CD4 nel corso del 3° Workshop sugli Antigeni di Differenziazione dei Leucociti Umani, tenutosi a Oxford, Inghilterra, nel 1986 (WS Code: 501, Section T) (5).

RIPRODUCIBILITÀ INTRALABORATORIO

Lo stesso giorno e con lo stesso citometro, sono state effettuate 12 determinazioni della percentuale di marcatura di un target positivo. Nelle seguenti tabelle sono riportati i risultati ottenuti:

Target positivo	Numero	Media (%)	SD	CV (%)
Linfociti CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearità

Per testare la linearità di marcatura di questo reagente, sono state mescolate, in proporzioni diverse pur mantenendo costante il numero totale di cellule, una linea cellulare positiva ((HPBALL)) e una linea cellulare negativa ((DAUDI)). Il rapporto linea cellulare positiva / negativa fornisce un dato lineare ordinabile su una scala da 0 a 100%.

Alcune aliquote sono state testate in base alla procedura descritta sopra. È stata inoltre calcolata la regressione lineare tra valori attesi e valori osservati.

Specificità	Regressione lineare	Linearità (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

LIMITAZIONI

1. La citometria a flusso può produrre falsi risultati se il citometro non viene allineato perfettamente, le perdite di fluorescenza non vengono correttamente compensate e le regioni non vengono posizionate attentamente.
2. È preferibile utilizzare una tecnica di lisi degli eritrociti con lavaggio perché il reagente non è stato ottimizzato per le cosiddette tecniche di lisi "senza lavaggio".
3. Seguendo le procedure descritte nel foglietto illustrativo con le informazioni tecniche, compatibili con le buone pratiche di laboratorio, è possibile ottenere risultati accurati e riproducibili.
4. L'anticorpo coniugato di questo reagente è calibrato in modo da offrire un rapporto segnale specifico/segnale non specifico ottimale. Di conseguenza, è importante rispettare il rapporto fra volume di reagente e volume di campione in tutti i test.
5. In caso di iperleucocitosi, diluire il sangue in PBS in modo da ottenere un valore di circa 5×10^9 leucociti/L (6).
6. In alcuni stati patologici, come insufficienza renale grave o emoglobinopatie, la lisi degli eritrociti può risultare lenta, incompleta o persino impossibile. In questo caso, è consigliabile isolare le cellule mononucleate usando un gradiente di densità (ad esempio, Ficoll) prima della colorazione (7).

Per esempi e riferimenti, vedere l'appendice.

MARCHI COMMERCIALI

Beckman Coulter, il logo stilizzato ed i marchi commerciali dei prodotti e servizi di Beckman Coulter menzionati qui, sono marchi commerciali o marchi commerciali registrati di Beckman Coulter, Inc., negli Stati Uniti e in altri paesi.

Legenda dei simboli

Il Glossario dei simboli è disponibile all'indirizzo beckman.com/techdocs (documento numero B60062)

	Especificaciones
Especificidad	CD4
Clon	13B8.2
Hibridoma	NS1 x balb/c
Inmunógeno	Human thymocytes
Inmunoglobulina	IgG1
Especie	Ratón
Purificación	Cromatografía de afinidad
Fluorocromo	R Phycoerythrin (PE)
Proporción molar	PE / Ig: 0,5 - 1,5
Excitación λ	488 nm
Pico de emisión	575 nm
Tampón	PBS pH 7,2 más 2 mg/mL BSA y 0,1 % NaN ₃

IOTest

Anticuerpo conjugado CD4-PE

[REF] A07751 100 tests; 2 mL, 20 μ L/prueba

Para uso diagnóstico *in vitro*

USO PREVISTO

Este anticuerpo conjugado a un fluorocromo permite la identificación y la numeración de las poblaciones celulares que expresan el antígeno CD4 presentes en muestras biológicas humanas por citometría de flujo.

PRINCIPIO

Esta prueba se basa en la capacidad de anticuerpos monoclonales específicos para unirse a los determinantes antigénicos expresados por leucocitos.

La tinción específica de los leucocitos se realiza incubando la muestra con el reactivo IOTest. A continuación, se eliminan los eritrocitos mediante lisis y los leucocitos, que no se ven afectados por este proceso, se analizan mediante citometría de flujo.

El citómetro de flujo mide la dispersión de la luz y la fluorescencia de las células. Permite acotar la población de interés dentro de una ventana electrónica, definida en un histograma que correlaciona la dispersión lateral de luz (Side Scatter o SS) con la dispersión frontal de la luz (Forward Scatter o FS). Se pueden utilizar otros histogramas que combinen dos de los distintos parámetros disponibles en el citómetro como apoyo para la fase de selección en función de la aplicación utilizada por el usuario.

La fluorescencia de las células acotadas se analiza para distinguir los eventos con tinción positiva de los eventos sin tefir. Los resultados se expresan como un porcentaje de eventos positivos en relación con todos los eventos adquiridos mediante la selección.

EJEMPLOS DE APLICACIONES CLÍNICAS

Caracterización de las poblaciones linfocitarias CD4+ en el transcurso de patologías del sistema inmunitario: SIDA (1) y otros déficits inmunitarios, enfermedades autoinmunes (2), hipersensibilidad, infecciones virales, restauración inmunitaria después del trasplante de médula ósea y/o de órganos. Seguimiento y fenotipado de las poblaciones linfocitarias CD4+ (3) en las hemopatías malignas como las leucemias y los linfomas.

REACTIVOS

Concentración: ver el certificado de análisis específico del lote en www.beckmancoulter.com.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. No use el reactivo después de la fecha de caducidad.
2. No lo congele.
3. Déjelo a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de su utilización.
4. Minimice el tiempo de exposición a la luz.
5. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, ya que esto puede provocar resultados falsos.
6. Las soluciones de anticuerpo que contienen azida sódica (NaN₃) deben manipularse con precaución. No ingerir y evitar todo contacto con la piel, la mucosa y los ojos.
Asimismo, en un medio ácido, la azida sódica puede formar ácido hidrazoico potencialmente peligroso. Cuando se vaya a desechar, se recomienda diluir el reactivo en abundante agua antes de verterlo en el sistema de drenaje para evitar la acumulación de azida sódica en tubos metálicos y el riesgo de explosión.
7. Todas las muestras sanguíneas deben considerarse posiblemente infecciosas y deben manipularse con cuidado (en especial, hay que llevar guantes, bata y gafas de protección).
8. No pipetear nunca con la boca y evitar todo contacto de las muestras con la piel, las mucosas y los ojos.
9. Los tubos para sangre y el material desechable utilizados para la manipulación deben eliminarse en recipientes especiales previstos para la incineración.
10. Los reactivos y los desechos deben eliminarse de acuerdo con los requisitos locales.

CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

No clasificado como tóxico



La hoja de datos de seguridad está disponible en beckman.com/techdocs

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los conjugados en forma líquida deben conservarse entre 2 y 8 °C en un lugar protegido de la luz, antes y después de abrir el frasco.

Estabilidad del vial cerrado: consulte la fecha de caducidad en el vial.

Estabilidad del vial abierto: el reactivo es estable durante 180 días.

MUESTRAS

La sangre venosa debe recogerse en tubos de muestra estériles que contengan una sal de EDTA como anticoagulante.

Las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente (18-25 °C) y no agitarse. Antes de tomar la muestra de prueba, es necesario homogeneizarla mediante una agitación suave.

Las muestras deben analizarse en el plazo de 24 horas tras la venopunción.

SIGNOS DE DETERIORO

Cualquier cambio en el aspecto físico de los reactivos puede indicar un deterioro, por lo que no debe utilizarse el reactivo.

En caso de deterioro del paquete o si los datos obtenidos indican una alteración del rendimiento, póngase en contacto con su distribuidor local o escriba a la siguiente dirección de correo electrónico:

CONTENIDO

El conservante de azida sódica puede formar compuestos explosivos en las tuberías metálicas del desagüe. Véase el NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Boletín de NIOSH: Peligro de explosión con la azida) (16/8/76).

Para evitar la posible acumulación de compuestos de azida, limpie con agua los tubos de desagüe tras la eliminación del reactivo sin diluir. Para desechar la azida sódica deben seguirse las normativas locales adecuadas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS CON EL KIT:

- Tubos y material de muestras necesarios para el muestreo.
- Pipetas automáticas para puntas desechables de 20, 100 y 500 µL.
- Tubos de hemólisis de plástico.
- Reactivo de lisis de glóbulos rojos con estado de lavado después de la lisis. Por ejemplo: VersaLyse (Ref. A09777).
- Reactivo de fijación de leucocitos. Por ejemplo: Solución de fijación IOTest 3 (Ref. A07800).
- Control isotópico PE : reactivo IOTest (Ref. A07796.).
- Tampón (PBS: 0,01 M de fosfato de sodio; 0,145 M de cloruro sódico; pH 7,2).
- Centrífuga.
- Agitador automático (tipo vórtex).
- Citómetro de flujo.

PROCEDIMIENTO CON EL REACTIVO VERSALYSE

Advertencia : El siguiente procedimiento es válido para aplicaciones estándar. Los volúmenes de muestra y/o de VersaLyse para algunas aplicaciones Beckman Coulter pueden ser diferentes. Si fuera el caso, seguir las instrucciones de la ficha técnica de la aplicación.

Para cada muestra analizada además del tubo problema, se debe incluir un tubo control en el que se incubarán las células con el control isotópico (Ref. A07796.).

1. Añada 20 µL de anticuerpo conjugado IOTest específico a cada tubo de ensayo y 20 µL del control isotópico a cada tubo de control.
2. Añadir 100 µL de la muestra que debe probarse en los 2 tubos. Mezclar suavemente en el Vórtex.
3. Incube entre 15 y 20 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C) y protegido de la luz.
4. Proceder, si es necesario, a la lisis de los eritrocitos siguiendo las recomendaciones del reactivo de lisis utilizado. Por ejemplo, si se desea utilizar VersaLyse (Ref. A09777), consultar la ficha técnica y seguir preferentemente el procedimiento denominado "con fijación concomitante" que consiste en añadir 1 mL de la mezcla "Fix-and-Lyse" preparada extemporáneamente. Mezclar seguidamente en el Vórtex durante un segundo e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en un lugar protegido de la luz. Si la muestra no contiene eritrocitos, añadir 2 mL de PBS.
5. Centrifugue durante 5 minutos a 150 x g a temperatura ambiente.
6. Elimine el sobrenadante mediante aspiración.
7. Vuelva a suspender el sedimento celular usando 3 mL de PBS.
8. Repita el paso 5.
9. Retire el sobrenadante mediante aspiración y vuelva a suspender el sedimento celular con:
0,5 mL o 1 mL de PBS más el 0,1 % de formaldehído si las preparaciones deben conservarse menos de 24 horas. (Se puede obtener un 0,1 % de PBS de formaldehído diluyendo 12,5 µL de solución fijadora IOTest 3 [REF A07800] a su concentración de 10x en 1 mL de PBS).
0,5 mL o 1 mL de PBS sin formaldehído si las preparaciones deben analizarse en un plazo de 2 horas.

Nota: En todos los casos, mantenga las preparaciones protegidas de la luz entre 2 y 8 °C.

VALORES ESPERADOS

Cada laboratorio debe establecer una lista de valores de referencia basada en un grupo de donantes sanos que pertenecen a la población local. Esto debe hacerse teniendo en cuenta la edad, el sexo, el origen étnico, y cualquier otra posible diferencia regional.

En nuestros laboratorios, se trató la sangre entera de 50 adultos sanos, utilizando el reactivo mencionado anteriormente. Los resultados obtenidos para la numeración de los eventos de interés positivos con este reactivo se agrupan en la siguiente tabla :

Linfocitos	Cantidad	Media (%)	DE	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

No Translation Available	Cantidad	Media (%)	DE	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

RENDIMIENTO

Los datos de rendimiento se obtienen utilizando el procedimiento descrito más arriba en muestras de sangre de 24 horas de antigüedad, recogidas en tubos estériles con una sal de EDTA como anticoagulante. Los análisis se llevan a cabo en las dos horas siguientes al inmunomarcaje.

ESPECIFICIDAD

El anticuerpo monoclonal (AcMo) 13B8.2 reconoce un épitope situado en la región V1 de la estructura inmunoglobulínica ("Ig-like") del antígeno CD4. Un estudio de la representación epitópica mediante mutaciones que enfocan las regiones extracitoplasmáticas de la molécula puso de manifiesto que la fijación del anticuerpo 13B8.2 sólo se veía afectada cuando la mutación atacaba a los residuos 88 y/o 89 (4). El AcMo 13B8.2 inhibe in vitro la fijación del Vih-1. El AcMo 13B8.2 se asignó al CD4 en el transcurso del 3º HLDA Workshop sobre Antígenos de Diferenciación de los Leucocitos Humanos, Oxford, Inglaterra, en 1986 (WS Código: 501, Sección T) (5).

REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO

En el mismo día y en el mismo citómetro, se llevaron a cabo 12 determinaciones del porcentaje de tinción de una población positiva. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente:

Objetivo positivo	Cantidad	Media (%)	DE	CV (%)
Linfocitos CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linealidad

Para comprobar la linealidad del marcaje con este reactivo, se mezclaron una línea celular positiva ((HPBALL)) y una línea celular negativa ((DAUDI)) en distintas proporciones para una concentración y a cantidad celular final constante, de modo que la proporción línea positiva/línea negativa de la mezcla fuera de 0 a 100 %.

Se procesaron las alícuotas según el procedimiento anteriormente descrito y se calculó la regresión lineal entre los valores esperados y los valores observados.

Especificidad	Regresión lineal	Linealidad (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

LIMITACIONES

1. La citometría de flujo puede producir resultados falsos si el citómetro no se ha alineado a la perfección, si las fugas de fluorescencia no se han compensado correctamente y si las regiones no se han colocado con atención.
2. Utilizar preferentemente una técnica de lisis de los eritrocitos con lavado, ya que este reactivo no ha sido optimizado para las técnicas de lisis denominadas "sin lavado".
3. Se obtendrán resultados exactos y reproducibles siempre que los procedimientos utilizados sean conformes al folleto técnico y compatibles con las prácticas correctas de laboratorio.
4. El anticuerpo conjugado de este reactivo se calibra para ofrecer la mejor relación de señal específica/señal no específica. Por lo tanto, es importante cumplir la relación de volumen del reactivo/volumen de la muestra en cada prueba.
5. En caso de hiperleucocitosis, diluya la sangre en PBS para obtener un valor de aproximadamente 5×10^9 leucocitos/L (6).
6. En algunos estados de la enfermedad, como el fallo renal grave o las hemoglobinopatías, la lisis de los eritrocitos puede ser lenta, incompleta o incluso imposible. En este caso, se recomienda aislar las células mononucleares por gradiente de densidad (por ejemplo, Ficoll) antes de la tinción (7).

Consulte el anexo para ver ejemplos y referencias.

MARCAS COMERCIALES

Beckman Coulter, el logotipo estilizado y las marcas de productos y servicios de Beckman Coulter aquí mencionadas son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Beckman Coulter, Inc. en Estados Unidos y otros países.

Lista de símbolos

El glosario de símbolos está disponible en beckman.com/techdocs (número de documento B60062)

	Especificações
Especificidade	CD4
Clone	13B8.2
Hibridoma	NS1 x balb/c
Imunogénio	Human thymocytes
Imunoglobulina	IgG1
Espécie	Rato
Purificação	Cromatografia de afinidade
Fluorocromo	R Phycoerythrin (PE)
Razão molar	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ de excitação	488 nm
Pico de emissão	575 nm
Tampão	PBS com pH 7,2 mais 2 mg/mL de ASB e 0,1% de NaN ₃

IOTest

Anticorpo conjugado CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 µL/teste

Para fins de diagnóstico *in vitro*

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Este anticorpo conjugado com fluorocromo permite a identificação e numeração das populações das células que expressão o antígeno CD4 presente em amostras biológicas humanas utilizando a citometria de fluxo.

PRINCÍPIO

Este teste baseia-se na capacidade de os anticorpos monoclonais específicos se ligarem aos determinantes antigénicos expressados por leucócitos.

A coloração específica dos leucócitos é realizada incubando a amostra com o reagente IOTest. Em seguida, os glóbulos vermelhos são removidos por lise e os leucócitos, que não são afetados por este processo, são analisados por citometria de fluxo.

O citómetro de fluxo mede a difusão de luz e a fluorescência das células. Permite delimitar a população de interesse dentro da janela eletrónica definida num histograma que correlaciona a difusão ortogonal de luz (dispersão lateral ou DL) e a difusão de luz em ângulos estreitos (dispersão frontal ou DF). É possível utilizar outros histogramas que combinam dois dos vários parâmetros disponíveis no citómetro como suporte na fase de delimitação, consoante a aplicação escolhida pelo utilizador.

A fluorescência das células delimitadas é analisada para distinguir os eventos de coloração positiva daqueles sem coloração. Os resultados são apresentados como uma percentagem de eventos positivos em relação a todos os eventos adquiridos por meio da delimitação.

EXEMPLOS DE APLICAÇÕES CLÍNICAS

Este reagente permite a caracterização das populações das células linfocíticas CD4+ nos desordens do sistema imune : AIDS (1) e outras imuno-deficiências, desordens auto-imunes (2), reacção de hipersensibilidade, infeções virais, restabelecimento da resposta imune depois duma transplantação de medula óssea e/ou outros órgãos. O seguimento e fenotipagem da população linfocítica CD4+ (3) nas discrasias sanguíneas malignas tais como leucemias e linfomas.

REAGENTES

Concentração : Consulte o certificado de análise específica do lote em www.beckmancoulter.com.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Não utilize o reagente depois da data de validade.
2. Não congele.
3. Aguarde que fique à temperatura ambiente (18–25 °C) antes da utilização.
4. Evite a exposição à luz.
5. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, caso contrário, poderão ocorrer falsos resultados.
6. As soluções de anticorpos que contêm azida sódica (NaN₃) devem ser manuseadas com cuidado. Não ingira e evite qualquer contacto com a pele, as mucosas e os olhos.
Adicionalmente, num meio ácido, a azida sódica pode formar ácido hidrazóico potencialmente perigoso. Se a sua eliminação for necessária, é recomendável que o reagente seja diluído num grande volume de água antes de ser vertido no sistema de drenagem, para evitar a acumulação de azida sódica em tubos metálicos e prevenir o risco de explosão.
7. Todas as amostras de sangue devem ser consideradas potencialmente infecciosas e manuseadas com cuidado (em especial, devem ser usados óculos, batas e luvas de proteção).
8. Nunca pipetar com a boca e evitar qualquer contacto das amostras com a pele, mucosa e olhos.
9. Os tubos de sangue e os materiais descartáveis utilizados para manuseamento devem ser eliminados em recipientes específicos destinados a incineração.
10. Os reagentes e os resíduos devem ser eliminados de acordo com os requisitos locais.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO GHS

Não classificado como perigoso

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

A forma de líquidos conjugados deve ser mantida entre 2 e 8 °C e protegida da luz, antes e depois do frasco ter sido aberto.

Estabilidade do frasco fechado: consulte a data de validade no frasco.

Estabilidade do frasco aberto: o reagente permanece estável durante 180 dias.

AMOSTRAS

O sangue venoso deve ser recolhido utilizando tubos estéreis que contenham um sal de AEDT como anticoagulante.

As amostras devem ser mantidas à temperatura ambiente (18–25 °C) e não devem ser agitadas. As amostras devem ser homogeneizadas, agitando-as levemente, antes de a amostra de teste ser retirada.

As amostras devem ser analisadas no prazo de 24 horas após a punção venosa.

EVIDÊNCIA DE DEGRADAÇÃO

Uma alteração no aspeto físico dos reagentes poderá indicar deterioração, pelo que o reagente não deve ser utilizado.

No caso de deterioração da embalagem ou se os dados obtidos mostrarem alguma alteração no desempenho, contacte o distribuidor local ou utilize o seguinte endereço de e-mail:

CONTEÚDO

A azida sódica utilizada como conservante pode formar compostos explosivos em sistemas de canalizações metálicas. Consulte o boletim do NIOSH: Explosive Azide Hazards (Perigos de explosão da azida) (16-8-76).

Para evitar a possível acumulação de compostos de azida, enxague as condutas de resíduos com água após a eliminação do reagente não diluído. A eliminação de azida sódica deve ser efetuada de acordo com os regulamentos locais adequados.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS COM O KIT:

- Tubos de amostras e materiais necessários para amostragem.
- Pipetas automáticas com pontas descartáveis para 20, 100 e 500 µL.
- Tubos de plástico para hemólise.
- Reagente de lise de glóbulos vermelhos com fase de lavagem após a lise. Por exemplo: VersaLyse (Ref. A09777).
- Reagente de fixação de leucócitos. Por exemplo: solução fixadora IOTest 3 (Ref. A07800).
- Controlo Isotópico PE : reagente IOTest (Ref. A07796.).
- Tampão (PBS: 0,01 M de fosfato de sódio; 0,145 M de cloreto de sódio; pH 7,2).
- Centrifugue.
- Agitador automático (tipo vórtex).
- Citómetro de fluxo.

PROCEDIMENTO COM REAGENTE VERSALYSE

Nota: O procedimento descrito a seguir é válido para aplicações padrões. Os volumes das amostras e/ou do VersaLyse para algumas aplicações Beckman Coulter podem ser diferentes. Se este for o caso, seguir as instruções sobre as técnicas de aplicação dadas.

Por cada amostra a analisar requer-se, além do tudo teste, um tubo controlo no qual as células são misturadas na presença do controlo isotópico (Ref. A07796.).

1. Adicione 20 µL de anticorpo conjugado de IOTest específico em cada tubo de teste e 20 µL do controlo isotópico em cada tubo de controlo.
2. Adicione 100 µL de amostra teste a cada tubo. Agitar os tubos no vortex suavemente.
3. Incube durante 15 a 20 minutos à temperatura ambiente (18–25 °C), protegido da luz.
4. Realize a lise dos glóbulos vermelhos, caso for necessário, seguindo as recomendações do reagente de lise utilizado. Como exemplo, se deseja utilizar VersaLyse (Ref. A09777), consulte o folheto e siga preferivelmente o procedimento conhecido pelo nome “Com fixação concomitante” que consiste em adicionar 1 mL da mistura de “Fix-and-Lyse” preparada extemporaneamente, agitar imediatamente no vortex por 1 segundo e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Se a amostra não contiver glóbulos vermelhos, adicionar 2 mL de PBS.
5. Centrifugue durante 5 minutos a 150 x g à temperatura ambiente.
6. Remova o sobrenadante por aspiração.
7. Suspenda novamente o precipitado celular com 3 mL de PBS.
8. Repita o passo 5.
9. Remova o sobrenadante por aspiração e suspenda novamente o precipitado celular com o seguinte:
0,5 mL ou 1 mL de PBS mais 0,1% de formaldeído se as preparações se destinarem a ser mantidas por menos de 24 horas. (É possível obter uma solução PBS com 0,1% de formaldeído diluindo 12,5 µL da solução fixadora IOTest 3 [REF A07800] à sua concentração de 10X em 1 mL de PBS).
0,5 mL ou 1 mL de PBS sem formaldeído se as preparações se destinarem a ser analisadas no prazo de 2 horas.

Nota: Mantenha sempre as preparações entre 2 e 8 °C e protegidas da luz.

VALORES ESPERADOS

Cada laboratório deve compilar uma lista de valores de referência baseados num grupo de dadores saudáveis, da população local. Deve ser feito tomando em conta a idade, sexo e grupo étnico assim como alguma outra potencial diferença regional.

Nos nossos laboratórios, o sangue total de 50 adultos saudáveis foi tratado utilizando o reagente anteriormente descrito. Os resultados obtidos sobre na contagem dos eventos positivos de interesse com este reagente são apresentados na seguinte tabela :

Linfócitos	Número	Média (%)	DP	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monócitos	Número	Média (%)	DP	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

DESEMPENHO

Os dados de realização são obtidos utilizando o procedimento descrito anteriormente nas amostras de sangue com 24 horas colhidas previamente em tubos estéreis com sal de EDTA como anticoagulante. A análise é executada no espaço de 2 horas a seguir à imuno-coloração.

ESPECIFICIDADE

O anticorpo monoclonal (mAb) 13B8.2 reconhece um epítipo situado sobre a região Ig-like V1 do antígeno CD4. Um estudo sobre o mapa epítipo, utilizando as mutações que caracterizam as regiões extra-citoplasmáticas da molécula demonstraram que a fixação do mAb 13B8.2 era unicamente afectada quando a mutação envolvia os resíduos 88 e /ou 89 (4). O mAb 13B8.2 inibe a fixação in vitro do HIV-1. O mAb 13B8.2 foi atribuído ao CD4 no 3º HLDA Workshop (Human Leucocyte Differentiation Antigens), que decorreu em Oxford, England em 1986 (WS Code : 501, Section : T) (5).

REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATÓRIO

No mesmo dia e utilizando o mesmo citómetro, foram processadas 12 medições da percentagem da coloração dum alvo positivo. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela seguinte:

Alvo positivo	Número	Média (%)	DP	CV (%)
Linfócitos CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearidade

Para testar a linearidade da coloração deste reagente, misturaram-se uma linha celular positiva ((HPBALL)) e uma linha celular negativa ((DAUDI)), em diferentes proporções com um número final constante de células, mas de modo que a razão linha positiva/linha negativa da mistura encontre-se dentro do intervalo 0 - 100%.

Foram coradas aliquotas utilizando o procedimento descrito sobre e foi calculada a regressão linear entre os valores observados e os esperados.

Especificidade	Regressão Linear	Linearidade (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

LIMITAÇÕES

1. A citometria de fluxo poderá produzir falsos resultados se o citómetro não tiver sido perfeitamente alinhado, se as fugas de fluorescência não tiverem sido compensadas corretamente e se as regiões não tiverem sido cuidadosamente posicionadas.
2. É preferível utilizar a técnica de lise dos glóbulos vermelhos com lavagem quando o reagente não foi optimizado pelas técnicas lise "sem lavagem".
3. Serão obtidos resultados exatos e reprodutíveis desde que os procedimentos utilizados estejam de acordo com o folheto técnico e cumpram as boas práticas laboratoriais.
4. O anticorpo conjugado deste reagente é calibrado para proporcionar a melhor relação entre sinal específico/sinal não específico. Por conseguinte, é importante respeitar a relação entre volume do reagente/volume da amostra em todos os testes.
5. No caso de uma hiperleucocitose, dilua o sangue em PBS para obter um valor de aproximadamente 5×10^9 leucócitos/L (6).
6. Em determinados estados de doença, como insuficiência renal grave ou hemoglobinopatias, a lise de glóbulos vermelhos poderá ser lenta, incompleta ou até impossível. Neste caso, recomenda-se isolar células mononucleadas utilizando um gradiente de densidade (por exemplo, Ficoll) antes da coloração (7).

Consulte o Anexo para obter exemplos e referências.

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logótipo estilizado e as marcas de produtos e serviços da Beckman Coulter mencionadas neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registadas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e noutros países.

Legenda dos símbolos

O Glossário de símbolos está disponível em beckman.com/techdocs (número do documento B60062)

	Specifikationer
Specificitet	CD4
Klon	13B8.2
Hybridom	NS1 x balb/c
Immunogen	Human thymocytes
Immunoglobulin	IgG1
Arter	Mus
Oprensning	Affinitetskromatografi
Fluorokrom	R Phycoerythrin (PE)
Molarforhold	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ -magnetisering	488 nm
Emissionsspids	575 nm
Buffer	PBS pH 7,2 plus 2 mg/mL BSA og 0,1% NaN ₃

IOTest Konjugeret antistof CD4-PE

[REF] A07751 100 tests; 2 mL, 20 μ L/test

Til *in vitro*-diagnostisk brug

TILSIGTET BRUG

Dette fluorokromkonjugerede antistof muliggør identifikation og tælling af cellepopulationer, der udtrykker CD4-antigen til stede i humane biologiske prøver ved anvendelse af flowcytometri.

PRINCIP

Denne test er baseret på specifikke monoklonale antistoffers evne til at binde sig til de antigene determinanter, der udtrykkes af leukocytter.

Den specifikke farvning af leukocytterne udføres ved inkubation af prøven med IOtest-reagenset. Erythrocyterne fjernes derefter med lysering, og leukocytterne, som ikke påvirkes af denne proces, analyseres ved flowcytometri.

Flowcytometeret måler lysets diffusion og cellernes fluorescens. Dette gør det muligt at afgrænse interessepopulationen inden for det elektroniske vindue, der defineres på et histogram, som korrelerer den ortogonale diffusion af lys (Side Scatter (sidespredning) eller SS) og diffusionen af lys med en snæver vinkel (Forward Scatter (forlæns spredning) eller FS). Andre histogrammer, der kombinerer to af de forskellige parametre, der er til rådighed på cytometret, kan benyttes som støtte under gating-trinnet, afhængig af den af brugeren valgte applikation.

De afgrænsede cellers fluorescens analyseres med henblik på at kunne skelne de positive farvningshændelser fra de ufarvede. Resultaterne udtrykkes som en procentdel af positive hændelser i relation til alle de hændelser, som erhverves ved gatingen.

EKSEMPLER PÅ KLINISKE ANVENDELSER

Dette reagens tillader karakterisering af CD4+ lymfocytiske cellepopulationer i immunsystemsygdomme: AIDS (1) og andre immundefekter, autoimmunsygdomme (2), overfølsomhedsreaktioner, virusinfektioner, genopretning af immunreaktion efter benmarvs- og/eller organtransplantation. Opfølgning og fenotypebestemmelse af CD4+-cellepopulationer (3) i ondartet bloddyskrasi som f.eks. leukæmi og lymphoma.

REAGENSER

Koncentration: Se partispecifikt analysecertifikat på www.beckmancoulter.com.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

1. Brug ikke reagenset efter udløbsdatoen.
2. Må ikke nedfryses.
3. Bring det til stuetemperatur (18-25 °C) før brug.
4. Minimér eksponering for lys.
5. Undgå mikrobiel kontaminering reagenserne, idet det kan føre til fejlagtige resultater.
6. Antistofopløsninger, der indeholder natriumazid (NaN₃), skal håndteres med forsigtighed. Må ikke indtages, og undgå enhver kontakt med hud, slimhinder og øjne.
I syremedier kan natriumazid desuden danne den potentielt farlige hydrogenazid. Hvis det skal bortskaffes, anbefales det, at reagenset fortyndes i en stor mængde vand, inden det hældes i kloakken, for at undgå ophobning af natriumazid i metalrør og dermed forebygge risikoen for eksplosioner.
7. Alle blodprøver skal anses som potentielt smittefarlige og skal behandles forsigtigt (husk især at bruge beskyttelseshandsker, forklæde og beskyttelsesbriller).
8. Pipetter aldrig med munden og undgå, at prøverne kommer i kontakt med hud, slimhinder og øjne.
9. Blodprøvetagningsrør og engangsmateriale, der bruges i forbindelse med håndteringen, skal bortskaffes i ad hoc-beholdere, der er beregnet til bortskaffelse.
10. Reagenser og affald skal bortskaffes i henhold til gældende lokale krav.

GHS FAREKLASSIFIKATION

Ikke klassificeret som farlig



Sikkerhedsdatablad findes på beckman.com/techdocs

OPBEVARING OG HOLDBARHED

Konjugaterne på væskeform skal opbevares ved mellem 2 og 8 °C og beskyttes mod lys både før og efter åbningen af hætteglasset.

Holdbarhed for lukket hætteglas: Se udløbsdatoen på hætteglasset.

Stabilitet i åbent hætteglas: Reagenset er stabilt i 180 dage.

PRØVER

Prøver af venøst blod skal udtages i sterile prøverør, der indeholder et EDTA-salt som antikoagulant.

Prøverne skal opbevares ved stuetemperatur (18-25 °C) og må ikke rystes. Prøverne skal homogeniseres ved forsigtig omrysten før udtagning af analyseprøven.

Prøverne skal behandles inden for 24 timer efter venepunktur.

TEGN PÅ FORRINGELSE

Ændringer i den måde, reagenset ser ud på, kan være tegn på forringelse, og reagenset må ikke anvendes.

I tilfælde af beskadiget emballage, eller hvis de opnåede data viser ydelsesændring, bedes du kontakte din lokale distributør eller benytte følgende e-mail-adresse:

INDHOLD

Natriumazid kan danne eksplosive forbindelser i drænledninger af metal. Se NIOSH-bulletin: Explosive Azide Hazard (16.8.76) (Fare for eksplosiv azid). For at undgå en eventuel akkumulering af azidforbindelser, skylles afløbsrør med vand efter bortskaffelse af uført reagens. Natriumazid skal bortskaffes i overensstemmelse med relevante lokale forskrifter.

PÅKRÆVEDE MATERIALER, SOM IKKE LEVERES MED SÆT:

- Prøvetagningsrør og materiale, der er påkrævet til prøvetagning.
- Automatiske pipetter med engangsspidser til 20, 100 og 500 µL.
- Plasmahæmolysatorer.
- Reagens til lysring af erythrocytter med vaskefase efter lysring. For eksempel: VersaLyse (ref. A09777).
- Reagens til leukocytfiksering. For eksempel: IOTest 3-fiksativ opløsning (ref. A07800).
- Isotypekontrol PE : IOTest-reagens (Ref. A07796.).
- Buffer (PBS: 0,01 M natriumphosphat; 0,145 M natriumchlorid; pH 7,2).
- Centrifuge
- Automatisk omrører (vortextype).
- Flowcytometer.

PROCEDURE MED VERSALYSE-REAGENS

Bemærk : Proceduren nedenfor gælder ved standardapplikationer. Prøve- og/eller VersaLyse-volumener kan for visse applikationer med Beckman Coulter være forskellige. Følg i sådanne tilfælde vejledningen på indlægssedlen med tekniske applikationer.

For hver prøve, der skal analyseres, er det ud over prøverøret nødvendigt med et kontrolrør, i hvilket cellerne blandes med den valgte isotypekontrol (Ref. A07796.).

1. Tilføj 20 µL af specifikt IOTest-konjugeret antistof for hvert testrør og 20 µL af den isotypiske kontrol for hvert kontrolrør.
2. Tilsæt 100 µL af testprøven til begge rør. Vortex rørene forsigtigt.
3. Inkubér i 15 til 20 minutter ved stuetemperatur (18-25 °C), beskyttet mod lys.
4. Lysér om nødvendigt erythrocytterne ved at følge vejledningen for det anvendte lyseringsreagens. Hvis der for eksempel anvendes VersaLyse (Ref. A09777), se i indlægssedlen for dette og følg fortrinsvis proceduren betegnet "with concomitant fixation (med samtidig fiksering)", som består af at tilsætte 1 mL "Fix-and-Lyse"-blandingen fremstillet umiddelbart. Vortex straks i et sekund og inkuber i 10 minutter ved stuetemperatur under beskyttelse mod lys. Hvis prøven ikke indeholder erythrocytter tilsættes 2 mL PBS.
5. Centrifuger i 5 minutter ved 150 x g ved stuetemperatur.
6. Fjern supernatanten via aspiration.
7. Resuspender cellepelleten med 3 mL PBS.
8. Gentag trin 5.
9. Fjern supernatanten vha. aspiration, og resuspender cellepelleten med:

0,5 mL eller 1 mL PBS plus 0,1 % formaldehyd, hvis præparaterne skal opbevares i under 24 timer. (En PBS med 0,1 % formaldehyd kan opnås ved at fortynde 12,5 µL IOTest 3 fiksativopløsning (REF A07800) ved en 10X koncentration i 1 mL PBS).

0,5 mL eller 1 mL PBS uden formaldehyd, hvis præparaterne skal analyseres inden for 2 timer.

Bemærk: Præparaterne skal under alle omstændigheder beskyttes mod lys og opbevares ved 2-8 °C.

FORVENTEDE VÆRDIER

Hvert laboratorium skal beregne en liste af referenceværdier baseret på en gruppe raske donorer fra lokalbefolkningen. Dette skal udføres under iagttagelse af alder, køn og etnisk gruppe såvel som alle andre potentielle regionale forskelle.

I vores laboratorier blev prøver af fuldblod fra 50 raske voksne behandlet ved anvendelse af reagenset beskrevet ovenfor. Resultaterne opnået ved tælling af positive hændelser af interesse med reagenset er angivet i tabellerne nedenfor :

Lymfocytter	Antal	Middelværdi (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocytter	Antal	Middelværdi (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

YDEEVNE

Prøveresultater er opnået ved anvendelse af proceduren beskrevet ovenfor på 24 timer gamle blodprøver forinden udtaget i sterile rør indeholdende EDTA-salt som antikoagulant. Analyserne er udført inden for 2 timer efter immunfarvning.

SPECIFICITET

Det monoklonale antistof (mAb) 13B8.2 genkender en epitop i den Ig-lignende V1-region i CD4-antigenet. En kortlægning af epitopen ved anvendelse af målrettede mutationer i de ekstracytoplasmatiske regioner af molekylet har vist, at binding af mAb 13B8.2 kun blev påvirket af mutationer, der involverer rest 88 og/eller 89 (4). MAb 13B8.2 inhiberer in vitro binding af HIV-1. MAb 13B8.2 blev tildelt til CD4 på 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, Oxford, England, afholdt i 1986 (WS Code: 501, Section : T) (5).

REPRODUCERBARHED INDEN FOR LABORATORIET

På den samme dag og ved anvendelse af det samme cytometer blev der udført 12 målinger af procentandelen af farvningen af et positivt mål. De opnåede resultater er sammenfattet i følgende tabel:

Positivt mål	Antal	Middelværdi (%)	SD	CV (%)
Lymfocytter CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearitet

For at teste lineariteten ved farvning med dette reagens blev en positiv cellelinie ((HPBALL)) og en negativ cellelinie ((DAUDI)) blandet i forskellige forhold med et konstant endeligt antal celler, således at forholdet mellem de positive og negative celler var i området fra 0 til 100%.

Proceduren beskrevet ovenfor blev anvendt til farvning af aliquots af celler, og den lineære regression mellem de forventede værdier og de observerede værdier blev beregnet.

Specificitet	Lineær regression	Linearitet (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

BEGRÆNSNINGER

- Flowcytometri kan give forkerte resultater, hvis cytometeret ikke er perfekt justeret, hvis der ikke er blevet kompenseret korrekt for fluorescenslækager, eller hvis områderne ikke er blevet placeret omhyggeligt.
- Det foretrækkes, at der anvendes en RBC-lyseringsteknik, der indeholder et vasketrin, da reagentet ikke er optimeret til lyseringsteknikker, der ikke indeholder et sådant.
- Der genereres nøjagtige og reproducerbare resultater, så længe de anvendte procedurer er i overensstemmelse med de tekniske anvisninger på indlægssedlen og god laboratoriepraksis.
- Det konjugerede antistof for dette reagens kalibreres for at kunne tilbyde det bedste specifikke forhold mellem signal/ikke-specifikt signal. Det er derfor vigtigt at overholde forholdet mellem reagensvolumen og prøvevolumen i hver enkelt test.
- I tilfælde af en hyperleukocytose skal blodet fortyndes i PBS for at opnå en værdi på ca. 5×10^9 leukocytter/L (6).
- I visse sygdomstilstande, f.eks. alvorligt nyresvigt eller hæmoglobinopati, kan lysering af røde celler være langsom, ufuldstændig eller endog umulig. I dette tilfælde anbefales det at isolere enkernede celler ved hjælp af en densitetsgradient (f.eks. Ficoll) forud for farvningen (7).

Se Tillæg for eksempler og referencer.

VAREMÆRKER

Beckman Coulter, det stiliserede logo og de Beckman Coulter produkt- og servicemærker, der er omtalt heri, er varemærker eller registrerede varemærker tilhørende Beckman Coulter, Inc. i USA og andre lande.

Symbolnøgle

En ordliste over symboler findes på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

	Specifikationer
Specificitet	CD4
Klon	13B8.2
Hybridom	NS1 x balb/c
Immunogen	Human thymocytes
Immunglobulin	IgG1
Arter	Mus
Rening	Affinitetskromatografi
Fluorokrom	R Phycoerythrin (PE)
Molförhållande	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ excitering	488 nm
Emissionstopp	575 nm
Buffert	PBS pH 7,2 plus 2 mg/mL BSA och 0,1 % NaN ₃

IOTest

Konjugerad antikropp

CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 μ L/test

För *in vitro*-diagnostik

AVSEDD ANVÄNDNING

Med denna fluorokromkonjugerade antikropp kan man i humana biologiska prover med hjälp av flödescytometri identifiera och räkna cellpopulationer som uttrycker CD4-antigen.

PRINCIP

Detta test är baserat på förmågan hos specifika monoklonala antikroppar att bindas till de antigena determinanter som uttrycks av leukocyter.

Specifik färgning av leukocyterna utförs genom att inkubera provet med IOTest-reagenset. De röda cellerna avlägsnas sedan via lysering och leukocyterna, som inte påverkas av denna process, analyseras med flödescytometri.

Flödescytometern mäter ljusdiffusion och fluorescens av celler. Det möjliggör avgränsningen av populationen av intresse i det elektroniska fönstret definierat i ett histogram, som korrelerar den rätvinkliga ljusspridningen (sidospridning eller SS) och spridningen av snävt ljus (framåtspridning eller FS). Andra histogram som kombinerar två av de tillgängliga parametrarna på cytometern, kan användas som stöd i gating-skedet beroende på tillämpningen som användaren har valt.

Fluorescensen av de begränsade cellerna analyseras för att skilja ut positivt färgade händelser från ofärgade händelser. Resultaten uttrycks som en procentandel av positiva händelser i relation till alla händelser som samlats in med hjälp av gating.

EXEMPEL PÅ KLINISKA TILLÄMPNINGAR

Den här reagensen gör så att karakterisering av CD4+ lymfocytiska cellpopulationer i immunsystemsjukdomar: AIDS (1) och andra immunbrister, autoimmuna störningar (2), överkänslighetsreaktioner, virusinfektioner, återställande av immunsvaret efter benmärgs- och/eller organtransplantation. Uppföljning och fenotypning av CD4+ cellpopulationer (3) i malign blod dyskrasi såsom leukemi och lymfom.

REAGENSER

Koncentration: Se det batchspecifika analyscertifikatet på www.beckmancoulter.com.

VARNING OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Använd inte reagenset efter utgångsdatumet.
2. Får ej frysas.
3. Låt den komma till rumstemperatur (18–25 °C) före användning.
4. Minimera exponering för ljus.
5. Undvik mikrobiell kontaminering av reagens. Det kan leda till felaktiga resultat.
6. Antikroppslösningar som innehåller natriumazid (NaN₃) bör hanteras med försiktighet. Inta inte internt och undvik all kontakt med hud, slemhinnor och ögon.
I syramedium kan natriumazid dessutom bilda potentiellt farlig hydrazinsyra. Om reagensen måste kasseras rekommenderar vi att den späds ut med en stor volym vatten innan den hälls ut i avloppssystemet för att undvika explosionsrisk och att natriumazid ackumuleras i metallrören.
7. Alla blodprover måste betraktas som potentiellt smittsamma och ska hanteras med försiktighet (i synnerhet vad gäller användande av skyddshandskar, rockar och skyddsglasögon).
8. Pipettera aldrig med munnen och låt inte hud, slemhinnor eller ögon komma i kontakt med prover eller reagens.
9. Blodprovsvrör och engångsmaterial som används för hantering ska kasseras i särskilda behållare avsedda för förbränning.
10. Reagens och avfall ska kasseras i enlighet med lokala krav.

RISKKLASSIFICERING ENLIGT GHS

Ej klassat som farligt



Safety Data Sheet (Säkerhetsdatablad) finns på beckman.com/techdocs

FÖRVARING OCH STABILITET

Konjugerade lösningar måste förvaras vid 2 – 8 °C och skyddas mot ljus före och efter det att ampullen öppnats.

Stabilitet i stängd ampull: se utgångsdatumet på ampullen.

Stabilitet i öppen ampull: reagenset är stabilt i 180 dagar.

PROVER

Venblod måste tas i sterila provrör med EDTA-salt som antikoagulant.

Proverna bör förvaras i rumstemperatur (18–25 °C) och inte skakas. Prover bör vara homogeniserade genom försiktig omrörning innan provet tas.

Proverna måste analyseras inom 24 timmar efter venpunktur.

TECKEN PÅ FÖRSÄMRING

Alla förändringar i reagensens fysiska utseende kan indikera försämring och att reagenset inte ska användas.

När det gäller förpackningsförsämring eller om erhållna data visar vissa prestandaförändringar, kontakta din lokala distributör eller använd följande e-postadress:

INNEHÅLL

Konservationsmedlet natriumazid kan bilda explosiva föreningar i avloppsledning av metall. Se NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (76-8-16) (Bulletin från den amerikanska motsvarigheten till arbetsmiljöverket: Fara för azidexplosion).

För att undvika risken för ansamling av azidföreningar ska avloppsrören spolas igenom med vatten efter att utspädda reagenser har kasserats. Kassering av natriumazid måste ske i enlighet med tillämpliga lokala regler.

MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE FÖLJER MED KITET:

- Provrör och nödvändigt material för provtagning.
- Automatiska pipetter med engångsspetsar för 20, 100 och 500 µL.
- Hemolysrör av plast.
- Lyseringsreagens för röda blodceller med tvätt efter lyseringen. Till exempel: VersaLyse (ref. A09777).
- Reagens för leukocytfixering. Till exempel: IOTest 3-fixeringslösning (ref. A07800).
- Isotypisk kontroll PE IOTest reagens: (Ref. A07796.).
- Buffert (PBS: 0,01 M natriumfosfat; 0,145 M natriumklorid; pH 7,2).
- Centrifugera.
- Automatisk omrörare (Vortex-typ).
- Flödescytometer.

PROCEDUR MED VERSALYSE-REAGENS

OBSERVERA: Följande procedur gäller för standard applikationer. Prov och/eller VersaLyse volymer för speciella Beckman Coulter applikationer kan vara olika. Om så är fallet, följ instruktionerna på applikationens produktblad.

För varje prov som analyseras behövs, förutom röret med prov, ett kontrollrör där cellerna är blandade med isotypisk kontroll (Ref. A07796.).

1. Lägg till 20 mikroliter av specifik IOTest-konjugerad antikropp till varje provrör, och 20 mikroliter av isotypisk kontroll till varje kontrollrör.
2. Tillsätt 100 µL prov till båda rören. Vortexa rören försiktigt.
3. Inkubera i 15 till 20 minuter vid rumstemperatur (18–25 °C) och skyddat mot ljus.
4. Utför därefter vid behov lyseringen genom att följa anvisningarna för det använda lyseringsreagenset. Om du till exempel vill använda VersaLyse (Ref. A09777), läs du produktbladet och följ lämpligen beskrivningen under rubriken "med samtidig fixering", som innebär att man tillsätter 1 mL av "Fix-and-Lyse"-lösningen, som bereds strax före användning. Vortexa genast i 1 sekund och inkubera därefter i rumstemperatur i 10 minuter i skydd mot ljus. Om provet inte innehåller erytrocyter tillsätt 2 mL PBS.
5. Centrifugera i 5 minuter vid 150 x g vid rumstemperatur.
6. Avlägsna ytskiktet genom aspiration.
7. Återsuspendera cellpelleten med 3 mL PBS.
8. Upprepa steg 5.
9. Avlägsna ytskiktet genom aspiration och återsuspendera cellpelleten med:

0,5 mL eller 1 mL av PBS plus 0,1 % formaldehyd om preparaten är avsedda att förvaras mindre än 24 timmar. (En 0,1 % formaldehyd-PBS kan erhållas genom spädning av 12,5 µL av IOTest 3-fixeringslösning (REF A07800) i dess 10X-koncentration i 1 mL PBS).

0,5 mL eller 1 mL PBS utan formaldehyd, om preparaten är avsedda att analyseras inom 2 timmar.

Anmärkning: Behåll i samtliga fall beredningarna vid 2 till 8 °C och skyddade från ljus.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Varje laboratorium måste compilera en referensvärdestabell baserad på en grupp friska donatorer från den lokala populationen. Hänsyn måste tas till såväl ålder, kön och etnisk tillhörighet som andra potentiella regionala skillnader.

På våra laboratorier behandlades helblod från 50 friska vuxna. Erhållna resultat för antalet positiva händelser av intresse visas i tabellen nedan :

Lymfocyter	Nummer	Medelvärde (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocyter	Nummer	Medelvärde (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

PRESTANDA

Data för prestanda erhålls med hjälp av ovan beskrivna metod på 24 timmar gamla blodprover som tagits i förväg i sterila rör med EDTA-salt som koagulationshämmare. Analysen utförs inom 2 timmar efter immunfärgning.

SPECIFICITET

Den monoklonala antikroppen (mAb) 13B8.2 identifierar en epitop belägen på den Ig-liknande V1 regionen på CD4 antigenet. En studie av den epitopiska kartan, användande mutationer med de extra-cytoplasmatiske regionerna av molekylen som mål har visat att fixeringen av mAb 13B8.2 bara påverkades när mutationen involverade delarna 88 och/eller 89 (4). MAb 13B8.2 hindrar in vitro fixationen av HIV-1. MAb13B8.2 bestämdes till CD4 under den 3:e HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, Oxford, England 1986 (WS Code : 501, Section : T) (5).

REPRODUCERBARHET INOM LABORATORIET

På samma dag och med användande av samma cytometer utfördes 12 mätningar av procent positiva mål. Erhållna resultat är summerade i följande tabell:

Positivt mål	Nummer	Medelvärde (%)	SD	CV (%)
Lymfocyter CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearitet

För att testa linjäriteten vid infärgning med detta reagens blandades en positiv cellinje ((HPBALL)) och en negativ cellinje ((DAUDI)) i olika proportioner, med det totala antalet celler konstant, så att förhållandet positiv / negativ cellinje i blandningen varierade från 0 till 100 %.

Aliquoter infärgades enligt ovanstående procedur och linjär regression mellan de förväntade värden och de erhållna värdena beräknades.

Specificitet	Linear regression	Linjäritet (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

BEGRÄNSNINGAR

- Flödescytometri kan ge falska resultat om cytometern inte har justerats perfekt, om fluorescensläckor inte har kompenserats korrekt och om regionerna inte har placerats noggrant.
- Det är bäst att använda en lyseringsmetod med tvätt eftersom detta reagens inte är optimerat för lyseringsmetoder av typen "no wash".
- Noggranna och reproducerbara resultat kommer att erhållas så länge de förfaranden som används är i enlighet med den tekniska bipacksedeln och förenliga med god laboratoriepraxis.
- Den konjugerade antikroppen för detta reagens är kalibrerad för att erbjuda det bästa specifika signal/icke-specifika signal-förhållandet. Därför är det viktigt att följa reagensvolym/provvolym-förhållandet i varje test.
- Vid hyperleukocytos, späd blodet i PBS för att erhålla ett värde på cirka 5×10^9 leukocyter/L (6).
- Vid vissa sjukdomstillstånd, såsom vid mycket svår njursvikt eller hemoglobinopatier, kan lysering av röda celler vara långsam, ofullständig eller till och med omöjlig. I detta fall är det rekommenderat att isolera mononukleära celler med användning av en densitetsgradient (till exempel Ficoll) innan färgningen (7).

Se bilagan för exempel och referenser.

VARUMÄRKEN

Beckman Coulter, den stiliserade logotypen och Beckman Coulters produkt- och tjänstmärken som nämns här är varumärken eller registrerade varumärken som tillhör Beckman Coulter, Inc. i USA eller andra länder.

Teckenförklaring för symboler

Ordlista för symboler finns på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

	Spesifikasjoner
Spesifisitet	CD4
Klon	13B8.2
Hybridom	NS1 x balb/c
Immunogen	Human thymocytes
Immunoglobulin	IgG1
Art	Mus
Rensing	Affinitetskromatografi
Fluorokrom	R Phycoerythrin (PE)
Molart forhold	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ -eksitasjon	488 nm
Strålingstopp	575 nm
Buffer	PBS pH 7,2 pluss 2 mg/mL BSA og 0,1 % NaN ₃

IOTest

Konjugert antistoff CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 μ L/test

For *in vitro*-diagnostisk bruk

TILTENKT BRUK

Dette fluorokromkonjugerte antistoffet gjør det mulig å påvise og angi en cellepopulasjon som uttrykker CD4-antigenet i humane biologiske prøver ved hjelp av flow-cytometri.

PRINSIPP

Denne testen er basert på evnen spesifikke monoklonale antistoffer har til å binde seg til antigen-determinantene uttrykt av leukocytter.

Spesifikk farging av leukocytene utføres ved inkubering av prøven med IOTest-reagenset. De røde cellene fjernes deretter ved lysing, og leukocytene, som er uberørt av denne prosessen, analyseres ved flowcytometri.

Flytcytometeret måler lysdiffusjon og cellenes fluorescens. Det gjør det mulig å avgrense populasjonen som skal undersøkes innenfor det elektroniske vinduet som er definert på et histogram, og som korrelerer den ortogonale lysspredningen (sidespredning eller SS) og spredningen av trangvinklet lys (foroverpredning eller FS). Andre histogrammer som kombinerer to av de ulike parametrene på cytometeret kan brukes som støtte ved gatingstadiet, avhengig av programmet som velges av brukeren.

Fluorescensen i de avgrensede cellene analyseres for å skille de positivt fargede hendelsene fra de ufargede. Resultatene er uttrykt som en prosentandel positive hendelser i forhold til alle hendelser innhentet ved gatingen.

EKSEMPLER PÅ KLINISKE ANVENDELSESOMRÅDER

Denne reagensen tillater karakterisering av CD4+ lymfatiske cellepopulasjoner i immunsystemlidelser: AIDS (1) og andre immunsykdommer, autoimmune lidelser (2), overfølsomhetsreaksjoner, virusinfeksjoner, restaurering av immunrespons etter benmargs- og/eller organtransplantasjon. Oppfølging og fenotyping av CD4+ cellepopulasjoner (3) i maligne blod dyskrasier som leukemier og lymfomer.

REAGENSER

Konsentrasjon: Se det lot-spesifikke analysesertifikatet på www.beckmancoulter.com.

ADVARSEL OG FORHOLDSREGLER

1. Reagenset må ikke brukes etter utløpsdatoen.
2. Må ikke fryses.
3. La det nå romtemperatur (18–25 °C) før bruk.
4. Bør ikke utsettes for lys.
5. Unngå mikrobiell kontaminering av reagensene, ellers kan det gi feil resultater.
6. Antistoffløsninger som inneholder natriumazid (NaN₃), skal håndteres med forsiktighet. Ikke til innvortes bruk. Unngå all kontakt med hud, slimhinner og øyne.
Videre kan natriumazid i et syremedium danne potensielt farlig hydrogenazid. Hvis reagenset må kasseres, anbefales det at det fortynnes i store mengder vann før det tømmes i avløpssystemet, slik at man unngår opphopning av natriumazid i metallrør, og for å hindre eksplosjonsfare.
7. Alle blodprøver må betraktes som potensielt smittefarlige og må håndteres med forsiktighet (gjelder spesielt: bruk av vernehansker, laboratoriefrakk og vernebriller).
8. Pipetter aldri med munnen og unngå all kontakt med prøvene på hud, slimhinner og øyne.
9. Blodprøverør og engangsmateriale som brukes til håndtering, skal kastes i beholdere beregnet for forbrenning.
10. Reagenser og avfall skal kastes i henhold til lokale krav.

GHS-FAREKLASSIFISERING

Ikke klassifisert som farlig



Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på beckman.com/techdocs

OPPBEVARING OG STABILITET

De konjugerte væskefasene må oppbevares mellom 2 og 8 °C, og beskyttes mot lys før og etter at hetteglasset er åpnet.

Stabilitet for lukket flaske: Se utløpsdatoen på flasken.

Stabilitet for åpnet flaske: reagenset er stabilt i 180 dager.

PRØVER

Veneblod må tas ved bruk av sterile rør som inneholder EDTA-salt som antikoagulant.

Prøvene skal oppbevares i romtemperatur (18–25 °C) og ikke ristes. Prøvene skal homogeniseres ved forsiktig risting før du tar testprøven.

Prøvene må analyseres innen 24 timer etter venepunksjon.

TEGN PÅ FORRINGELSE

Endringer i reagensenes fysiske utseende kan være tegn på redusert kvalitet, og slike reagenser skal ikke brukes.

I tilfelle emballasjen skulle være ødelagt eller hvis dataene som er innhentet skulle vise endring mht. ytelse, kan du kontakte din lokale forhandler eller bruke følgende e-postadresse:

INNHold

Natriumazid kan danne eksplosive blandinger i metalliske avløpsrør. Se NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Fare for eksplosive azider) (16.8.76).

For å unngå mulig opphopning av azidforbindelser må avløpsrør skylles med vann etter avhending av uførtynnet reagens. Avfallshåndtering av natriumazid må skje i samsvar med relevante lokale forskrifter.

NØDVENDIGE MATERIALER SOM IKKE FØLGER MED SETTET:

- Prøvetakingsrør og materiale nødvendig for prøvetaking.
- Automatiske pipetter med engangsspisser til 20, 100 og 500 µL.
- Hemolyserør av plast.
- Rød celledyseringsreagens med vasketrinn etter lysring. For eksempel: VersaLyse (ref. A09777).
- Leukocyt-fikseringsreagens. For eksempel: IOTest 3-fikseringsløsning (ref. A07800).
- Isotyp kontroll PE : IOTest-reagens (Ref. A07796.).
- Buffer (PBS: 0,01 M natriumfosfat; 0,145 M natriumklorid; pH 7,2).
- Sentrifuger.
- Automatisk omrører (vortekstype).
- Flytcytometer.

PROSEDYRE MED VERSALYSE-REAGENS

Merk : Prosedyren som er beskrevet nedenfor er gyldig ved standardanvendelser. Volumet av prøvemateriale og/eller VersaLyse til enkelte anvendelser med Beckman Coulter vil kunne variere. Hvis dette er tilfelle skal anvisningene på det tekniske vedlegget for anvendelsen følges.

For hver analyserte prøve, i tillegg til testglasset, er det nødvendig med et kontrollglass hvor cellene blandes i nærvær av den isotype kontrollen (Ref. A07796.).

1. Ha 20 µL av det spesifikke IOTest-konjugerte antistoffet opp i hvert prøverør, og 20 µL av isotype-kontrollen opp i hvert kontrollrør.
2. Tilsett 100 µL av testprøven til begge glassene. Bland glassene varsomt med Vortex-blander.
3. Inkuber i 15 til 20 minutter ved romtemperatur (18–25 °C), beskyttet mot lys.
4. Deretter gjøres om nødvendig lyse av de røde cellene, i henhold til anbefalingene for lyse-reagensen som brukes. Som eksempel, dersom du ønsker å benytte VersaLyse (Ref. A09777), se vedlegget og følg helst prosedyren som kalles "med samtidig fiksering", og som består av tilsetning av 1 mL "Fix-and-Lyse"-blandingen som tilberedes for dette. Det blandes umiddelbart med Vortex i ett sekund og inkuberes i 10 minutter ved romtemperatur, beskyttet mot lys. Hvis prøven ikke inneholder røde celler tilsettes det 2 mL PBS.
5. Sentrifugeres i 5 minutter ved 150 x g ved romtemperatur.
6. Fjern supernatanten ved aspirasjon.
7. Resuspender cellepelletten i 3 mL PBS.
8. Gjenta trinn 5.
9. Fjern supernatanten ved aspirasjon, og resuspender cellepelletten ved hjelp av:

0,5 mL eller 1 mL PBS pluss 0,1 % formaldehyd hvis preparatene skal oppbevares i mindre enn 24 timer. (En 0,1 % formaldehyd-PBS kan oppnås ved å fortynne 12,5 µL IOTest 3-fikseringsløsning (REF A07800) ved 10X konsentrasjon av denne i 1 mL PBS).

0,5 mL eller 1 mL PBS uten formaldehyd hvis preparatene skal analyseres innen 2 timer.

Merk: I alle tilfeller skal preparatene oppbevares mellom 2 og 8 °C og beskyttet mot lys.

FORVENTEDE VERDIER

Hvert laboratorium må fylle ut en oversikt over referanseverdier basert på en gruppe friske givere fra den lokale befolkningen. Dette må gjøres ved å ta i betraktning alder, kjønn og etnisk tilhørighet, likeså andre potensielle regionale forskjeller.

I våre laboratorier ble prøver av fullblod fra 50 friske voksne behandlet med reagensene som er beskrevet ovenfor. Resultatene for antall positive hendelser av interesse med denne reagensen kan finnes i tabellene nedenfor :

Lymfocytter	Nummer	Gjennomsnitt (%)	SD	VK (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocytt	Nummer	Gjennomsnitt (%)	SD	VK (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

YTELSE

Resultatdata hentes ved å bruke prosedyren som beskrives over på 24 timer gamle blodprøver som er oppsamlet i sterile rør med EDTA-alt som antikoaguleringsagent. Analysen utføres innen 2 timer etter immunofarging.

SPESIFISITET

Det monoklonale antistoffet (mAb) 13B8.2 gjenkjenner en epitop i den Ig-liknende V1-regionen på CD4-antigenet. En studie av epitopkartet, med bruk av mutasjoner som er innsiktet på de ekstracyttoplasmiske områdene i molekylet, har vist at fiksering av mAb 13B8.2 bare ble påvirket når mutasjonen omfattet 88- og/eller 89-residualene (4). MAb 13B8.2 hemmer in vitro-fiksering av HIV-1. MAb13B8.2 ble tilordnet til CD4 under den 3dje HLDA-"Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens" i Oxford, England, i 1986 (WS-kode: 501, avsnitt : T) (5).

REPRODUSERBARHET INNENFOR LABORATORIET

På samme dag og med samme cytometer ble det gjennomført 12 målinger av prosentvis farging av et positivt mål. Resultatene som ble funnet er gitt i sammendrag i følgende tabell:

Positivt mål	Nummer	Gjennomsnitt (%)	SD	VK (%)
Lymfocytter CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearitet

For å teste linearitet for farging av denne reagensen, ble en positiv cellelinje ((HPBALL)) og en negativ cellelinje ((DAUDI)) blandet i forskjellige forhold med et konstant endelig antall celler, slik forhold mellom positive linje og negativ linje for blandingen lå i området fra 0 til 100 %.

Alikvoter ble farget med prosedyren som er beskrevet ovenfor og lineær regresjon mellom forventede verdier og observerte verdier ble beregnet.

Spesifisitet	Lineær regresjon	Linearitet (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

BEGRENSNINGER

- Flowcytometri kan gi falske resultater hvis cytometeret ikke har blitt justert nøyaktig, hvis fluorescenslekkasjer ikke er kompensert riktig, og hvis regionene ikke er nøyte plassert.
- Det er å foretrekke å bruke RBC-lyseteknikk med et vasketrinn, da denne reagensen ikke er optimalisert for lyseteknikker uten vasking.
- Nøyaktige og reproducerbare resultater vil oppnås så lenge de anvendte prosedyrene er i samsvar med det tekniske pakningsvedlegget og god laboratoriepraksis.
- Det konjugerte antistoffet til dette reagenset er kalibrert for å oppnå best mulig forhold mellom spesifikt signal og ikke-spesifikt signal. Derfor er det viktig å overholde forholdet mellom reagensvolum og prøvevolum i hver test.
- Ved hyperleukocytose fortynnes blodet i PBS for å oppnå en verdi på omtrent 5×10^9 leukocytter/L (6).
- Ved visse sykdomstilstander, for eksempel alvorlig nyresvikt eller hemoglobinopati, kan lyseringen av røde celler være langsom, ufullstendig eller til og med umulig. I dette tilfellet anbefales det å isolere mononukleære celler ved hjelp av en densitetsgradient (for eksempel Ficoll) før farging (7).

Se vedlegget for eksempler og referanser.

VAREMERKER

Beckman Coulter, den stiliserte logoen og vare- og servicemerkene til Beckman Coulter som er omtalt her, er varemerker eller registrerte varemerker som tilhører Beckman Coulter, Inc. i USA og andre land.

Symbolforklaring

Symbolordliste er tilgjengelig på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

	Προδιαγραφές
Ειδικότητα	CD4
Κλώνος	13B8.2
Υβρίδιωμα	NS1 x balb/c
Ανοσογόνο	Human thymocytes
Ανοσοσφαιρίνη	IgG1
Είδος	Mus
Κάθαρση	Χρωματογραφία συγγένειας
Φθοριόχρωμα	R Phycocerythrin (PE)
Γραμμομοριακή αναλογία	PE/Ig: 0,5 - 1,5
διέγερση λ	488 nm
Μέγιστη τιμή εκπομπών	575 nm
Ρυθμιστικό Διάλυμα	PBS pH 7,2 συν 2 mg/mL BSA και 0,1% NaN ₃

ΙΟTest

Συζευγμένο αντίσωμα CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 µL/εξέταση

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Αυτό το αντίσωμα συζευγμένο με ένα φθοριόχρωμα επιτρέπει την ταυτοποίηση και την καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν το αντιγόνο CD4 και που είναι παρόντες σε ανθρώπινα βιολογικά δείγματα μέσω κυτταρομετρίας ροής.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Αυτή η εξέταση βασίζεται στην ικανότητα συγκεκριμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων να δεσμεύονται στους αντιγονικούς καθοριστές που εκφράζονται από τα λευκοκύτταρα.

Η ειδική χρώση των λευκοκυττάρων πραγματοποιείται μέσω της επώασης του δείγματος με το αντιδραστήριο ΙΟTest. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αφαιρούνται στη συνέχεια με λύση και τα λευκοκύτταρα, τα οποία δεν επηρεάζονται από αυτήν τη διαδικασία, αναλύονται με κυτταρομετρία ροής.

Το κυτταρόμετρο ροής μετρά τη διάχυση φωτός και τον φθορισμό των κυττάρων. Καθιστά δυνατή την οριοθέτηση του πληθυσμού ενδιαφέροντος εντός του ηλεκτρονικού παραθύρου που ορίζεται σε ένα ιστόγραμμα, το οποίο συσχετίζει την ορθογώνια διάχυση φωτός (πλάγια σκέδαση ή SS) και τη διάχυση φωτός κλειστής γωνίας (πρόσθια σκέδαση ή FS). Άλλα ιστογράμματα που συνδυάζουν δύο από τις διαθέσιμες διαφορετικές παραμέτρους του κυτταρόμετρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν υποστηρικτικά κατά το στάδιο της οριοθέτησης, ανάλογα με την εφαρμογή που επιλέγει ο χρήστης.

Ο φθορισμός των οριοθετημένων κυττάρων αναλύεται προκειμένου να είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των θετικά σημασμένων συμβάντων και των μη σημασμένων συμβάντων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό των θετικών συμβάντων σε σχέση με το σύνολο των συμβάντων που ελήφθησαν από την οριοθέτηση.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ

Αυτό το αντιδραστήριο επιτρέπει τον χαρακτηρισμό πληθυσμών λεμφοκυττάρων CD4+ σε διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος: AIDS (1) και άλλες ανοσοανεπάρκειες, αυτοάνοσες διαταραχές (2), αντιδράσεις υπερευαισθησίας, ιογενείς λοιμώξεις, αποκατάσταση της ανοσολογικής απάντησης μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών ή/και οργάνου. Παρακολούθηση και προσδιορισμός του φαινότυπου των πληθυσμών κυττάρων CD4+ (3) σε κακοήθειες δυσκρασίες του αίματος, όπως λευχαιμίες και λεμφώματα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Συγκέντρωση: Δείτε το συγκεκριμένο πιστοποιητικό ανάλυσης της κάθε παρτίδας στο www.beckmancoulter.com.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Μη χρησιμοποιείτε το αντιδραστήριο μετά την ημερομηνία λήξης.
- Μην καταψύχετε.
- Αφήστε το να περιέλθει σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) πριν από τη χρήση.
- Ελαχιστοποιήστε την έκθεση στο φως.
- Αποφύγετε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διαφορετικά ενδέχεται να προκύψουν ψευδή αποτελέσματα.
- Να χειρίζεστε τα διαλύματα αντισωμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου (NaN₃) με προσοχή. Μην εισπνέετε και αποφεύγετε κάθε επαφή με το δέρμα, τους βλεννογόνους και τα μάτια.
Επιπλέον, σε όξινο μέσο, το αζίδιο του νατρίου μπορεί να σχηματίσει ένα δυνητικά επικίνδυνο υδραζωτικό οξύ. Αν χρειαστεί να απορριφθεί, συνιστάται η αραιώση του αντιδραστηρίου με μεγάλη ποσότητα νερού πριν από την έκχυση στο αποχετευτικό σύστημα, προκειμένου να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίου του νατρίου στις μεταλλικές σωληνώσεις και να αποτραπεί ο κίνδυνος έκρηξης.
- Πρέπει να θεωρείτε όλα τα δείγματα αίματος δυνητικά μολυσματικά και να τα χειρίζεστε με προσοχή (ειδικότερα: να φοράτε προστατευτικά γάντια, ποδιές και γυαλιά).
- Αποφύγετε κάθε επαφή της πιπέττας με το στόμα καθώς και κάθε επαφή των δειγμάτων με το δέρμα, τους βλεννογόνους και τα μάτια.
- Τα σωληνάρια αίματος και το υλικό μίας χρήσης που χρησιμοποιούνται για τον χειρισμό πρέπει να απορρίπτονται σε ειδικά δοχεία που προορίζονται για αποτέφρωση.
- Τα αντιδραστήρια και τα απόβλητα πρέπει να απομακρύνονται σύμφωνα με τις τοπικές απαιτήσεις.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ GHS

Δεν ταξινομείται ως επικίνδυνο

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Οι υγρές συζευγμένες ουσίες διατηρούνται σε θερμοκρασίες μεταξύ 2 και 8 °C προστατευμένες από το φως, πριν και μετά από το άνοιγμα του φιαλιδίου.

Σταθερότητα κλειστού φιαλιδίου: δείτε ημερομηνία λήξης που αναγράφεται επάνω στο φιαλίδιο.

Σταθερότητα ανοιχτού φιαλιδίου: το αντιδραστήριο παραμένει σταθερό για 180 ημέρες.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα δείγματα φλεβικού αίματος πρέπει να διατηρούνται σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιέχουν άλας EDTA ως αντιπηκτικό.

Τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) και δεν θα πρέπει να ανακινούνται. Πριν από τη λήψη του δείγματος προς εξέταση, τα δείγματα πρέπει να ομογενοποιούνται με ήπια ανάδευση.

Τα δείγματα πρέπει να αναλύονται εντός 24 ωρών από τη φλεβοκέντηση.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ

Οποιαδήποτε μεταβολή στην εμφάνιση των αντιδραστηρίων είναι πιθανό να υποδεικνύει αλλοίωση και το αντιδραστήριο δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται.

Σε περίπτωση αλλοίωσης της συσκευασίας ή εάν τα δεδομένα που λήφθηκαν παρουσιάζουν κάποια αλλοίωση της απόδοσης, επικοινωνήστε με τον τοπικό σας διανομέα ή χρησιμοποιήστε την ακόλουθη διεύθυνση e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Το συντηρητικό αζιδίου του νατρίου μπορεί να σχηματίσει εκρηκτικές ενώσεις στους μεταλλικούς αποχετευτικούς αγωγούς. Δείτε το ενημερωτικό δελτίο του NIOSH: Explosive Azide Hazard (Κίνδυνος έκρηξης αζιδίου) (16/8/76)

Για να αποφύγετε την ενδεχόμενη συσσώρευση ενώσεων αζιδίου, να εκπλύνετε τους σωλήνες αποβλήτων με νερό μετά την απόρριψη μη αραιωμένου αντιδραστηρίου. Η απόρριψη του αζιδίου του νατρίου πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους αντίστοιχους τοπικούς κανονισμούς.

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ:

- Σωλήνες δειγματοληψίας και υλικό που είναι απαραίτητο για τη δειγματοληψία.
- Αυτόματες πιπέτες με ρύγχη μιας χρήσης για 20, 100 και 500 µL.
- Πλαστικά σωληνάρια αιμόλυσης.
- Αντιδραστήριο λύσης ερυθροκυττάρων με στάδιο πλύσης μετά τη λύση. Για παράδειγμα: VersaLyse (Ref. A09777).
- Αντιδραστήριο μονιμοποίησης λευκοκυττάρων. Για παράδειγμα: Διάλυμα μονιμοποίησης IOTest 3 (Ref. A07800).
- Ισοτυπικός Έλεγχος PE : αντιδραστήριο IOTest (Κωδ. A07796.).
- Ρυθμιστικό διάλυμα (PBS: 0,01 M φωσφορικό νάτριο, 0,145 M χλωριούχο νάτριο, pH 7,2).
- Φυγόκεντρος.
- Αυτόματος αναδευτήρας (τύπου περιδίνησης).
- Κυτταρόμετρο ροής.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ VERSALYSE

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η παραπάνω διαδικασία ισχύει για τις τυποποιημένες εφαρμογές. Οι όγκοι των δειγμάτων ή/και του VersaLyse για ορισμένες εφαρμογές Beckman Coulter μπορούν να διαφέρουν. Σε μια τέτοια περίπτωση, ακολουθείστε τις οδηγίες του τεχνικού φυλλαδίου της εφαρμογής.

Για κάθε δείγμα προς ανάλυση, προβλέψτε εκτός του δοκιμαστικού σωλήνα, έναν σωλήνα ελέγχου μέσα στον οποίο τα κύτταρα θα βρίσκονται υπό την παρουσία του ισοτυπικού ελέγχου (Κωδ. A07796.).

1. Προσθέστε 20 µL ειδικού συζευγμένου αντισώματος IOTest σε κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο και 20 µL του ισοτυπικού μάρτυρα σε κάθε σωληνάριο μάρτυρα.
2. Προσθέστε 100 µL του προς εξέταση δείγματος στους 2 σωλήνες. Ανακινήστε ελαφρά με Vortex.
3. Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) για 15 έως 20 λεπτά, προστατεύοντας από το φως.
4. Προχωρήστε, εάν είναι απαραίτητο, στη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ακολουθώντας τις οδηγίες του αντιδραστηρίου λύσης που χρησιμοποιείτε. Για παράδειγμα, εάν επιθυμείτε να χρησιμοποιήσετε το VersaLyse (Κωδ. A09777), αναφερθείτε στις τεχνικές οδηγίες και ακολουθείστε κατά προτίμηση την διαδικασία «με συνακόλουθη στερεότητα» που συνίσταται στο να προσθέσετε 1 mL του μείγματος "Fix-and-Lyse" που κατασκευάζεται αυτοσχέδιως. Ανακινήστε αμέσως με Vortex ένα δευτερόλεπτο και επώαστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από εστίες φωτός. Αν το δείγμα δεν περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια, προσθέστε 2 mL PBS.
5. Φυγοκεντρήστε για 5 λεπτά στα 150 x g σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Αφαιρέστε το υπερκείμενο με αναρρόφηση.
7. Πραγματοποιήστε επανεναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος με 3 mL PBS.
8. Επαναλάβετε το βήμα 5.
9. Αφαιρέστε το υπερκείμενο με αναρρόφηση και επανεναιωρήστε το κυτταρικό ίζημα με:

0,5 mL ή 1 mL PBS συν 0,1% φορμαλδεΐδη, εάν τα παρασκευάσματα πρόκειται να φυλαχθούν για λιγότερο από 24 ώρες. (Μπορείτε να παρασκευάσετε διάλυμα 0,1% φορμαλδεΐδης/PBS αραιώνοντας 12,5 µL του μονιμοποιητικού διαλύματος IOTest 3 (REF A07800) 10πλάσιας συγκέντρωσης σε 1 mL PBS).

0,5 mL ή 1 mL PBS χωρίς φορμαλδεΐδη, αν τα παρασκευάσματα πρόκειται να αναλυθούν εντός 2 ωρών.

Σημείωση: Σε κάθε περίπτωση, φυλάσσετε τα παρασκευάσματα προστατευμένα από το φως, σε θερμοκρασία μεταξύ 2 και 8 °C.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Κάθε εργαστήριο οφείλει να καθιερώσει μια λίστα με τιμές αναφοράς βασισμένες σε μια ομάδα από υγιείς δότες που ανήκουν στον ντόπιο πληθυσμό. Για τη λίστα αυτή πρέπει να ληφθούν υπόψη η ηλικία, το φύλο, η εθνική καταγωγή, καθώς και η οποιαδήποτε άλλη πιθανή τοπική διαφορά.

Στα εργαστήριά μας εξετάστηκε το ολικό αίμα 50 υγιών ενηλίκων, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο που περιγράφηκε παραπάνω. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν για την καταμέτρηση των θετικών συμβάντων με αυτό το αντιδραστήριο ομαδοποιήθηκαν στον παρακάτω πίνακα :

Λεμφοκύτταρα	Αριθμός	Μέση τιμή (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Μονοκύτταρα	Αριθμός	Μέση τιμή (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

ΑΠΟΔΟΣΗ

Χρησιμοποιώντας την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω γίνεται η απόκτηση των δεδομένων της επίδοσης των 24-ώρων δειγμάτων του αίματος, που συλλέγησαν προηγουμένως σε αποστειρωμένα φιαλίδια που περιείχαν άλας EDTA ως αντιπηκτικό. Η ανάλυση εκτελείται μέσα σε 2 ώρες μετά από την ανοσοχρώση.

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Το μονοκλωνικό αντίσωμα (MA) 13B8.2 αναγνωρίζει έναν επίτοπο στην περιοχή V1 της ανοσοσφαιρινικής δομής ("Ig-like") του αντιγόνου CD4. Μία μελέτη του επιτοπικού χάρτη μέσω μεταλλάξεων που στοχεύουν τις εξωκυτταροπλασματικές περιοχές του μορίου έδειξε ότι η προσκόλληση του MA 13B8.2 δεν επηρεάζεται παρά μόνο όταν η μετάλλαξη άγγιζε τα κατάλοιπα 88 ή/και 89 (4). Το MA 13B8.2 αναστέλλει in vitro την προσκόλληση του VIH-1. Το MA 13B8.2 συσχετίστηκε με το CD4 κατά τη διάρκεια του 3ου Συνεδρίου HLDA για τα Αντιγόνα Διαφοροποίησης των Ανθρώπινων Λευκοκυττάρων, Όξφορντ, Αγγλία, το 1986 (Κωδικός WS: 501, Παράγραφος T) (5).

ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Την ίδια ημέρα και μέσω του ίδιου κυτταρομετρητή ροής πραγματοποιήθηκαν 12 προσδιορισμοί του ποσοστού σήμανσης ενός θετικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν ομαδοποιήθηκαν στον παρακάτω πίνακα:

Θετικός στόχος	Αριθμός	Μέση τιμή (%)	SD	CV (%)
Λεμφοκύτταρα CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Γραμμικότητα

Προκειμένου να ελεγχθεί η γραμμικότητα σήμανσης αυτού του αντιδραστηρίου, μία θετική κυτταρική σειρά ((HPBALL)) και μία αρνητική κυτταρική σειρά ((DAUDI)) αναμείχθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες και με σταθερή τελική κυτταρική ποσότητα, έτσι ώστε η αναλογία της θετικής σειράς/αρνητικής σειράς του μείγματος να κυμαίνεται από 0 έως 100%.

Τα τμήματα σημάνθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και η γραμμική παλινδρόμηση των αναμενόμενων τιμών έναντι των τιμών που παρατηρήθηκαν υπολογίστηκε.

Ειδικότητα	Γραμμική Παλινδρόμηση	Γραμμικότητα (R2)
CD4-PE	Y = 1 X - 0,38	0,9998

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- 1. Η κυτταρομετρία ροής ενδέχεται να παράγει ψευδή αποτελέσματα αν το κυτταρόμετρο δεν είναι σωστά ευθυγραμμισμένο, αν οι διαρροές φθορισμού δεν έχουν αντισταθμιστεί σωστά και αν οι περιοχές δεν έχουν τοποθετηθεί προσεκτικά.
- 2. Χρησιμοποιείτε κατά προτίμηση μια τεχνική λύσης των ερυθροκυττάρων με πλύση καθώς η λειτουργία αυτού του αντιδραστηρίου δεν είναι η βέλτιστη για τις τεχνικές λύσης "χωρίς πλύση".
- 3. Ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα προκύπτουν στο μέτρο που οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι σύμφωνες με το ένθετο τεχνικών οδηγιών και συμβατές με τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- 4. Το συζευγμένο αντίσωμα αυτού του αντιδραστηρίου είναι βαθμονομημένο ώστε να προσφέρει την καλύτερη αναλογία ειδικής σήμανσης/μη ειδικής σήμανσης. Γι' αυτό είναι σημαντικό να τηρείτε την αναλογία όγκου αντιδραστηρίου/όγκου δείγματος σε κάθε εξέταση.
- 5. Σε περίπτωση υπερλευκοκυττάρωσης, αραιώστε το αίμα σε PBS ώστε να επιτευχθεί τιμή περίπου 5 x 10⁹ λευκοκύτταρα/L (6).
- 6. Σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως η σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια ή οι αιμοσφαιρινοπάθειες, η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ενδέχεται να είναι αργή, ατελής ή και ανέφικτη. Σε αυτήν την περίπτωση, συνιστάται η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων με διαβάθμιση πυκνότητας (για παράδειγμα Ficoll) πριν από τη χρώση (7).

Δείτε το Παράρτημα για παραδείγματα και παραπομπές.

ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ

Η επωνυμία Beckman Coulter, το τυποποιημένο λογότυπο και τα σήματα προϊόντων και υπηρεσιών της Beckman Coulter που αναφέρονται στο παρόν είναι εμπορικά σήματα ή σήματα κατατεθέντα της Beckman Coulter, Inc. στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε άλλες χώρες.

Υπόμνημα συμβόλων

Το γλωσσάριο συμβόλων είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση beckman.com/techdocs (αριθμός εγγράφου B60062)

	仕様
特異性	CD4
クローン	13B8.2
ハイブリドーマ	NS1 x balb/c
免疫原	Human thymocytes
免疫グロブリン	IgG1
動物種	マウス
精製	アフィニティークロマトグラフィー
蛍光色素	R Phycoerythrin (PE)
モル比	PE / Ig : 0.5 - 1.5
λ励起	488 nm
発光のピーク	575 nm
緩衝化剤	PBS(pH 7.2) + 2 mg/mL BSAおよび0.1% NaN ₃

IOTest コンジュゲート抗体 CD4-PE

[REF] A07751 100 tests; 2 mL, 20 µL/テスト

体外診断用医薬品

用途

この蛍光標識抗体は、フローサイトメトリーを用いて、ヒトの生体検体中に存在するCD4抗原を発現する細胞集団の同定および計数を可能にします。

原理

このテストは、白血球が発現する抗原決定因子に対する特異的モノクローナル抗体の結合能に基づいています。

白血球の特異的染色は、検体をIOTest試薬とインキュベートすることによって行います。次に、赤血球を溶解によって除去し、このプロセスの影響を受けない白血球をフローサイトメトリーによって分析します。

フローサイトメーターは、細胞の光拡散および蛍光を測定します。これにより、直角散乱光（側方散乱、SS）および鋭角散乱光（前方散乱、FS）と相関するヒストグラム上で規定した電子枠内で対象集団の限界設定が可能になります。ユーザーが選択したアプリケーションに依存して、サイトメーターで利用可能な種々のパラメーターの2つを組み合わせたその他のヒストグラムが、ゲーティング段階の補助として利用できます。

陽性染色イベントと未染色イベントを鑑別するために、区分した細胞の蛍光を測定します。結果は、ゲーティングで得られた全イベントに対する陽性イベントの比率として表します。

臨床応用の例

この試薬により、免疫系疾患におけるCD4+リンパ球細胞集団の特性評価が可能になります。AIDS（1）およびその他の免疫不全、自己免疫疾患（2）、過敏反応、ウイルス感染、骨髄や臓器移植後の免疫応答の回復などです。白血球やリンパ腫などの悪性血液疾患におけるCD4+細胞集団の追跡調査および表現型検査（3）。

試薬

濃度: ロット別分析証明書 (www.beckmancoulter.com) をご覧ください。

警告および注意

- 有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 凍結しないでください。
- 使用前に室温（18～25°C）にしてください。
- 露光をできるだけ避けてください。
- 試薬の微生物汚染を避けてください。誤った結果の原因となる場合があります。
- アジ化ナトリウム（NaN₃）を含む抗体溶液は慎重に扱う必要があります。体内に摂取してはならず、皮膚、粘膜および眼との接触はすべて避けてください。
また、酸性媒体では、アジ化ナトリウムから潜在的危険性のあるアジ化水素酸が生成されることがあります。アジ化ナトリウムを含む試薬を廃棄する必要がある場合、金属製のパイプにアジ化ナトリウムが蓄積しないように、また爆発の危険性を防ぐために、試薬を多量の水で希釈してから排水システムに廃棄することを推奨します。
- すべての血液検体は感染性の可能性があるとみなして慎重に取り扱う必要があります（特に保護手袋、実験着、ゴーグルの着用）。
- サンプルを口に含んだり、肌、粘膜および目に直接触れないようにしてください。
- 使用済みの採血管およびディスプレイ製品は、焼却用の専用容器に入れて廃棄してください。
- 試薬や廃棄物は地方自治体の要件に従って廃棄してください。

GHSハザード分類

危険有害物質には分類されない



安全性データシートは、beckman.com/techdocsで入手できます

保管および安定性

コンジュゲート液は、バイアル瓶を開封する前および開封した後に関わらず、2 ~ 8℃ の遮光した場所に保管してください。
未開封のバイアルの安定性：バイアルの有効期限を参照してください。
開封後のバイアル：試薬は180日間安定しています。

検体

静脈血は、抗凝固剤としてEDTA塩を含有する無菌チューブを用いて採取しなければなりません。
検体は室温（18 ~ 25℃）で保管し、揺らさないようにする必要があります。検体は、テスト検体を採取する前に、穏やかな撹拌によって均質化する必要があります。
この検体は、静脈穿刺から24時間以内に分析する必要があります。

変質や劣化の兆候

試薬の物理的な外観の変化は劣化の徴候である場合があります、その試薬を使用してはなりません。
梱包が破損している場合、得られたデータが何らかの性能の変化を示す場合、お近くの販売業者または以下のメールアドレスにお問い合わせください。
immuno-techsup@beckmancoulter.com

内容

保存剤のアジ化ナトリウムは、金属製排水管内で爆発性化合物を生成するおそれがあります。NIOSH Bulletinを参照してください: アジド爆発危険性 (76/8/16)
アジド化合物が蓄積する可能性を回避するため、未希釈の試薬を廃棄した後は排水管を水で洗い流します。アジ化ナトリウムは地方自治体の規定に従い適切に廃棄してください。

ご用意いただくもの:

- ・ サンプリングに必要なサンプリングチューブと材料。
- ・ 使い捨てチップ付き自動ピペット（100および500 µL用）。20
- ・ プラスチックの溶血チューブ。
- ・ 溶血処理後に洗浄操作した赤血球溶血試薬。例：VersaLyse（製品番号A09777）。
- ・ 白血球固定試薬。例：IOTest 3固定液（製品番号A07800）。
- ・ アイソタイプ対照PE：IOTest試薬（製品番号A07796）。
- ・ 緩衝化剤（PBS：0.01 Mリン酸ナトリウム、0.145 M塩化ナトリウム、pH 7.2）。
- ・ 遠心機
- ・ 自動アジテーター（ボルテックスタイプ）。
- ・ フローサイトメーター

VERSALYSE試薬による手順

注記：下記の手順は標準的なアプリケーションで有効です。一部の弊社アプリケーションでは、検体およびVersaLyseの量が異なる場合があります。その場合は、アプリケーション技術書類に従ってください。

分析する各検体について、試験チューブのほか、アイソタイプ対照の存在中で細胞を混合する対照チューブ1本が必要です（製品番号A07796）。

1. IOTest 共役特異抗体 20 µL を各試験チューブに、アイソタイプコントロール 20 µL を対照チューブに追加します。
2. 両方のチューブに100 µLの試験検体を添加します。チューブを穏やかに撹拌します。
3. 遮光した状態で、室温（18 ~ 25℃）で15 ~ 20分間インキュベートします。
4. 必要に応じて、使用する溶解試薬の推奨事項に従い、赤血球を溶解します。例えば、VersaLyse（REF A09777）を使用する場合、パンフレットを参照し、その場で調製した「固定/溶解」混和液を1 mL添加して「同時に固定」するという手順に従うことが推奨されます。その後直ちに1秒間撹拌し、遮光した室温で10分間インキュベートします。検体に赤血球が含まれていない場合、PBSを2 mL添加します。
5. 室温で5分間遠心分離（150 x g）します。
6. 吸引により上清を除去します。
7. 3 mLのPBSを用いて細胞ペレットを懸濁します。
8. ステップ5を繰り返します。
9. 吸引により上清を除去し、以下により細胞ペレットを再懸濁します。

調製液の保存期間が24時間以内の場合、ホルムアルデヒド0.1%を含むPBS 0.5 mLまたは1 mL。（0.1%のホルムアルデヒドを含むPBSは12.5 µLのIOTest 3固定液（REFA07800）を1 mLのPBSに10倍の濃度で希釈して得られます。）

調製液を2時間以内に分析する場合、ホルムアルデヒドを含まないPBS 0.5 mLまたは1 mL。

注記：いかなる場合でも、調製液は2 ~ 8℃に保ち、遮光してください。

期待値

各検査室は地域集団の健康ドナーに基づいた基準値リストを作成する必要があります。地域差とともに年齢、性別、民族を考慮して実行しなければなりません。

弊社検査室では、上記の試薬を用いて健康成人50名の全血検体を取り扱いました。本試薬による陽性事象数測定で得た結果を以下の表に示します：

リンパ球	番号	平均（％）	SD	CV（％）
CD4-PE+	50	55.91	10.82	19.4

単球	番号	平均 (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90.86	4.97	5.47

性能

性能データは、以前に抗凝固剤としてEDTA塩を含有する無菌チューブに採取した24時間血液検体を対象に、上述の手順を用いて取得しなければなりません。分析は、免疫染色後2時間以内に行います。

特異性

モノクローナル抗体 (mAb) 13B8.2は、CD4抗原のIg様V1領域に位置するエピトープを認識します。分子の細胞質外領域を標的とした変異を用いたエピトープマップの研究により、変異が88番目または89番目の残基に関わる場合、mAb 13B8.2の固定のみが影響を受けることが示されています (4)。mAb 13B8.2はHIV-1のin vitroでの固定を阻害します。mAb 13B8.2は、1986年に英国オックスフォードでの3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (第3回ヒト白血球分化抗原に関するHLDAワークショップ) において、CD4にアサインされました (WSコード : 501、セクションT) (5)。

施設内再現性

同日に血球計算器、12件の陽性標的の染色率を測定しました。取得した結果は、下表に表示されています。

陽性標的細胞	番号	平均 (%)	SD	CV (%)
リンパ球+CD4-PE	12	37.84	0.80	2.1

直線性

本試薬の染色の直線性を検査するため、陽性細胞ライン(HPBALL)と陰性細胞ライン(DAUDI)の混合比が0～100%の範囲に収まるように、異なる割合で一定の最終細胞数を用いて混合しました。

上記の手順に従って分取を染色し、期待値と実測値の線形回帰を算出しました。

特異性	線形回帰	直線性 (R ²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0.38$	0.9998

制限事項

- フローサイトメトリーは、血球計算器が完全に配列されていない場合、蛍光リークが正しく相殺されていない場合、および領域が慎重に配置されていない場合、誤った結果を示す可能性があります。
- この試薬は「洗浄のない」溶解法には適していないため、洗浄手順を含む赤血球溶解法の使用が推奨されます。
- 取扱説明書および対応する検査室の実施基準に従って作業する限り、正確かつ再現性のある結果が得られます。
- この試薬の結合抗体は、特異的シグナル/非特異的シグナル比が最適となるようにキャリブレーションされています。そのため、各テストでは、試薬量/検体量比を順守することが重要です。
- 白血球増加症の場合、白血球数がおおよそ 5×10^9 個/Lとなるよう、血液をPBSで希釈してください (6)。
- 重度の腎不全やヘモグロビン異常など、特定の疾患状態では、赤血球の溶解が遅くなったり、不完全になったり、あるいは溶解できないことさえあります。この場合、染色する前に密度勾配 (Ficollなど) を使用して単核細胞を分離することを推奨します (7)。

附録にある例および参考文献を参照してください。

商標

ここに記載されているBeckman Coulter、ロゴマーク、ならびにベックマン・コールターの商品およびサービスマークは、ベックマン・コールターの米国およびその他の国における商標と登録商標です。

記号凡例

記号一覧は、beckman.com/techdocsで入手できます (文書番号B60062)



	Specifikacijos
Specifiškumas	CD4
Klonas	13B8.2
Hibridoma	NS1 x balb/c
Imunogenas	Human thymocytes
Imunoglobulinas	IgG1
Rūšis	Pelė
Išgryninimas	Giminingumo chromatografija
Fluorochromas	R Phycoerythrin (PE)
Molinis santykis	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ žadinimas	488 nm
Spinduliuotės smailė	575 nm
Buferinis tirpalas	7,2 pH fosfato buferinis tirpalas plius 2 mg/ml GSA ir 0,1 % NaN ₃

„IOTest“

Konjuguotas antikūnas CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 ml, 20 µl vienam
tyrimui

In vitro diagnostiniam naudojimui

NAUDOJIMO PASKIRTIS

Naudojant šį su fluorochromu konjuguotą antikūną, tėkmės citometrijos būdu galima identifikuoti ir išskaičiuoti ląstelių populiacijas, išreiškiančias CD4 antigeną, esantį žmogaus biologiniuose mėginiuose.

PRINCIPAS

Šis tyrimas pagrįstas specifinių monokloninių antikūnų gebėjimu jungtis prie antigenų determinantų, kuriuos ekspresuoja leukocitai.

Specifinis leukocitų dažymo procesas atliekamas mėginį inkubuojant reagentu „IOTest“. Tada lizuojant pašalinami eritrocitai ir srauto citometrijos būdu analizuojami leukocitai, kurie per šį etapą nepaveikiami.

Srauto citometru matuojama ląstelių šviesos sklaida ir fluorescencija. Šiuo būdu galima tiriamąją populiaciją apiboti histogramoje apibrėžtu elektroniniu langu, kuris koreliuoja su šviesos sklaida stačiu kampu (šonine sklaida arba ŠS) ir šviesos sklaida smailiu kampu (priekine sklaida arba FS). Kitos citometre įdiegtos histogramos, kuriose derinami du skirtingi parametrai, gali būti naudojamos kaip papildoma priemonė nustatant atrankos intervalus, žiūrint, kokią naudojimo būdą pasirinko naudotojas.

Analizuojant apribotų ląstelių fluorescenciją, teigiamai nudažyti įvykiai atskiriami nuo neigiamai nudažytų. Rezultatai išreiškiami kaip teigiamų įvykių procentinė dalis visų įvykių, gautų nustatius atrankos intervalą, atžvilgiu.

KLINIKINIO NAUDOJIMO PAVYZDŽIAI

Naudojant šį reagentą galima charakterizuoti CD4+ limfocitinių ląstelių populiacijas sergant imuninės sistemos ligomis: AIDS (1) ir kitomis imunodeficito ligomis, autoimuninėmis ligomis (2), padidėjusio jautrumo reakcijomis, virusinėmis infekcijomis, atkuriant imuninės sistemos reakciją po kaulų čiulpų ir (arba) organų transplantacijos. CD4+ ląstelių populiacijų stebėjimas ir fenotipavimas (3) sergant piktybinėmis kraujo diskrazijomis, pavyzdžiui, leukemijomis ir limfomomis.

REAGENTAI

Koncentracija: žr. specifinės partijos analizės sertifikatą adresu www.beckmancoulter.com.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Reagento nenaudoti pasibaigus galiojimo laikui.
2. Neužšaldyti.
3. Prieš naudojant reikia leisti sušilti iki kambario temperatūros (18–25 °C).
4. Laikykite kuo mažiau apšviestoje vietoje.
5. Saugokite, kad reagentai nebūtų užteršti mikrobais, nes antraip gali būti gaunami klaidingi rezultatai.
6. Su antikūnų tirpalais, kurių sudėtyje yra natrio azido (NaN₃), reikia elgtis atsargiai. Nevartokite į vidų ir saugokitės, kad nepatektų ant odos, gleivinės ir į akis.
Be to, rūgščioje terpėje natrio azidas gali išskirti potencialiai pavojingą hidrazo rūgštį. Jei jį reikia pašalinti, prieš pilant į nutekėjimo sistemą, reagentą rekomenduojama praskiesti dideliu vandens kiekiu, kad būtų išvengta natrio azido kaupimosi metaliniuose vamzdžiuose ir išvengta sprogo pavojaus.
7. Visi kraujo mėginiai turi būti laikomi potencialiai užkrečiamais ir su jais turi būti elgiamasi atsargiai (itin svarbu dėvėti apsaugines pirštines, apsiaustus ir akinus).
8. Jokiu būdu netraukite pipete burna ir venkite mėginių kontakto su oda, gleivine ir akimis.
9. Panaudoti kraujo mėgintuvėliai ir vienkartinės medžiagos turėtų būti išmetami į sudeginamas ad hoc talpyklas.
10. Reagentai ir atliekos turi būti šalinami pagal vietinius reikalavimus.

GHS PAVOJINGUMO KLASIFIKACIJA

Neklasifikuojama kaip pavojinga



Saugos duomenų lapą galima gauti interneto svetainėje techdocs.beckman.com

LAIKYMAS IR STABILUMAS

Prieš atidarant buteliuką ir jį atidarius konjuguotas skystąsias formas reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje ir saugoti nuo šviesos.

Uždaryto buteliuko stabilumas: žr. ant buteliuko nurodytą galiojimo laiką.

Atidaryto buteliuko stabilumas: reagentas lieka stabilus 180 d.

MĖGINIAI

Veninio kraujo mėginius reikia imti į sterilius mėgintuvėlius su EDTA druska kaip antikoagulantu.

Mėginius reikia laikyti kambario temperatūroje (18–25 °C) ir nekratyti. Prieš paimant tiriamąjį mėginį reikia atsargiai sujudinti mėginus, kad jie taptų vienalyčiai.

Mėginiai turi būti išanalizuoti per 24 valandas po venų punkcijos.

KOKYBĖS PABLOGĖJIMO POŽYMAI

Bet koks reagentų fizinės išvaizdos pokytis gali reikšti pablogėjusias gaminių savybes, todėl tokio reagento naudoti negalima.

Jei pastebite pakuotės gedimą arba jei gauti duomenys rodo apie tam tikrą veikimo duomenų pasikeitimą, kreipkitės į vietinį platintoją arba naudokite toliau pateiktą el. pašto adresą:

TURINYS

Natrio azido konservantas metalo vamzdynuose gali sudaryti sprogiosius junginius. Žr. „NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard“ (Nacionalinio darbų saugos ir sveikatos instituto biuletinį: sprogstamojo azido pavojus) (76-8-16).

Norėdami išvengti galimo azido junginių susikaupimo, išpylę į kanalizacijos sistemą neatskiesto reagento, vandeniu praplaukite nutekamuosius vamzdžius.

Natrio azidas turi būti šalinamas pagal taikomų vietos reglamentų reikalavimus.

REIKALINGOS, BET SU RINKINIU NEPATEIKTOS MEDŽIAGOS

- Mėginiams imti reikalingi mėginių ėmimo mėgintuvėliai ir medžiagos.
- Automatinės pipetės su vienkartiniais antgaliais, skirtos 20, 100 ir 500 µl tūrio mėginiams.
- Plastikiniai hemolizės mėgintuvėliai.
- Raudonųjų kraujo kūnelių lizavimo reagentas su plovimo etapu baigus lizuoti. Pavyzdys: „VersaLyse“ (kat. nr. A09777).
- Leukocitų fiksavimo reagentas. Pavyzdys: fiksavimo tirpalas „IOTest 3“ (kat. Nr. A07800).
- Izotipinė kontrolinė medžiaga PE: „IOTest“ reagentas (REF A07796).
- Buferinis tirpalas (fosfato buferinis tirpalas: 0,01 M natrio fosfato; 0,145 M natrio chlorido; pH 7,2).
- Nucentrifuguokite.
- Automatinis maišytuvas (sūkurinio tipo).
- Srauto citometras.

PROCEDŪRA NAUDOJANT REAGENTĄ „VERSALYSE“

Pastaba: toliau aprašoma procedūra tinka standartiniams įrenginiams. Kai kuriuose „Beckman Coulter“ įrenginiuose gali būti naudojami kitokie mėginio ir (arba) „VersaLyse“ tūriai. Tokiu atveju laikykitės įrenginio techniniame lapelyje pateiktųjų instrukcijų.

Analizuojant kiekvieną mėginį, be tiriamojo mėgintuvėlio reikia naudoti vieną kontrolinį mėgintuvėlį, kuriame ląstelės sumaišytos su izotipine kontroline medžiaga (REF A07796).

- 20 µl specifinio IOTest konjuguoto antikūno įpilkite į kiekvieną tiriamąjį mėgintuvėlį ir 20 µl izotipinės kontrolės medžiagos įpilkite į kiekvieną kontrolės mėgintuvėlį.
- Į abu mėgintuvėlius įpilkite po 100 µl tiriamojo mėginio. Mėgintuvėlius atsargiai išmaišykite sūkuriniu būdu.
- 15–20 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (18–25 °C), saugodami nuo šviesos.
- Pvz., jei norite naudoti „VersaLyse“ (nuor. A09777), žr. lankstinuką ir pageidautina vadovaukitės procedūra, vadinama „su viena laikiu fiksavimu“, kuri apima 1 ml iškart paruošto „Fix-and-Lyse“ mišinio įpylimą. Iškart vieną sekundę maišykite ir 10 min. inkubuokite kambario temperatūroje, saugodami nuo šviesos. Jeigu bandinys sudėtyje nėra raudonųjų ląstelių, įpilkite 2 ml PBS.
- 5 minutes centrifuguokite veikiant 150 x g jėgai kambario temperatūroje.
- Išsiurbdami pašalinkite supernatantą.
- Iš naujo suspenduokite ląstelių nuosėdas, naudodami 3 ml fosfato buferinį tirpalą.
- Pakartokite 5 veiksmą.
- Išsiurbdami pašalinkite supernatantą ir iš naujo suspenduokite ląstelių nuosėdas, naudodami toliau nurodytas medžiagas.

0,5 ml arba 1 ml PBS ir 0,1 % formaldehido, jeigu preparatai bus laikomi trumpiau nei 24 val. (0,1 % formaldehido PBS galima gauti, 12,5 µl 10X koncentracijos fiksatyvo tirpalo „IOTest 3“ (REF A07800) atskiedus 1 ml PBS.)

0,5 ml arba 1 ml fosfato buferinio tirpalo be formaldehido, jeigu preparatai bus analizuojami per 2 val.

Pastaba. Visais atvejais preparatus laikykite 2–8 °C temperatūroje ir saugodami nuo šviesos.

TIKĖTINOS VERTĖS

Kiekviena laboratorija turi pagal vietinės populiacijos sveikų donorų grupės duomenis susidaryti pamatinių verčių sąrašą. Tai darant reikia atsižvelgti į amžių, lytį, etninę grupę ir visus kitus galimus regioninius skirtumus.

Mūsų laboratorijose 50 sveikų suaugusiųjų viso kraujo mėginiai buvo apdoroti pirmiau aprašytu reagentu. Toliau pateiktose lentelėse nurodyti šį reagentą naudojant gauti dominančių įvykių teigiamų atvejų skaičiaus rezultatai.

Limfocitai	Skaičius	Vidurkis (%)	SN	VK (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocitai	Skaičius	Vidurkis (%)	SN	VK (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

VEIKIMAS

Efektyvumo duomenys gaunami pirmiau aprašytą procedūrą atliekant su 24 valandų senumo kraujo mėginiais, anksčiau paimtais į sterilius mėgintuvėlius su EDTA druska, kaip antikoagulantu. Analizė atliekama per 2 valandas po imuninio nusidažymo.

SPECIFIŠKUMAS

Monokloninis antikūnas (mAb) 13B8.2 atpažįsta CD4 antigeno į lg panašiam V1 regione esantį epitopą. Epitopų žemėlapis tyrimas naudojant į molekules ekstracitoplazminius regionus nukreiptas mutacijas parodė, kad mAb 13B8.2 fiksacija paveikiama tik tada, kai mutacija susijusi su 88 ir (arba) 89 liekanomis (4). MAb 13B8.2 slopina HIV-1 in vitro fiksaciją. MAb13B8.2 buvo CD4 priskirtas per 3-iają konferenciją dėl žmogaus leukocitų diferencijavimo antigenų (ŽLDA), vykusią Oksforde, Anglijoje, 1986 m. (WS kodas: 501, T skyrius) (5).

ATKURIAMUMAS VIENOJE LABORATORIJOJE

Tą pačią dieną tuo pačiu citometru atlikta 12 teigiamų tiriamųjų objektų nusidažymų procentinio skaičiaus tyrimų. Gauti rezultatai apibendrinti toliau pateiktoje lentelėje.

Teigiamas taikiny	Skaičius	Vidurkis (%)	SN	VK (%)
Limfocitai +CD4-PE	12	37,84	0,80	2,1

Tiesiškumas

Tiriant šio reagento nudažymo tiesiškumą, teigiamųjų ląstelių linija (HPBALL) ir neigiamųjų ląstelių linija (DAUDI) sumaišytos įvairiomis proporcijomis, išlaikant nekintamą galutinį ląstelių skaičių, kad mišinio teigiamųjų ir neigiamųjų ląstelių santykis kito nuo 0 % iki 100 %.

Alikvotinės dalys nudažytos taikant pirmiau aprašytą procedūrą ir skaičiuota tiesinė regresija tarp laukiamų ir stebimų verčių.

Specifiškumas	Tiesinė regresija	Tiesiškumas (R ²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

RIBOJIMAI

- Atliekant srauto citometriją klaidingi rezultatai gali būti gauti tuo atveju, jei citometras nebuvo tiksliai sureguliuotas, fluorescencijos nuotėkiai nebuvo tinkamai kompensuoti ar regionai nebuvo kruopščiai išdėstyti.
- Pageidautina naudoti RBC lizavimo metodiką su plovimo veiksmu, nes šis reagentas nebuvo optimizuotas lizavimo be plovimo veiksmo metodikoms naudoti.
- Tikslūs ir atkuriami rezultatai bus gaunami tol, kol naudojamos procedūros atitiks techniniame lapelyje pateiktą informaciją ir bus atliekamos laikantis geros laboratorijos praktikos.
- Šio reagento konjuguotas antikūnas sukalibruotas taip, kad būtų gaunamas geriausias specifinio ir nespecifinio signalų santykis. Dėl šios priežasties atliekant kiekvieną tyrimą svarbu tiksliai laikytis nurodyto reagento ir mėginio tūrių santykio.
- Hiperleukocitozės atveju kraują atskieskite fosfato buferiniu tirpalu, kad gautumėte maždaug 5×10^9 leukocitų/l koncentraciją (6).
- Sergant kai kuriomis ligomis, pavyzdžiui, sunkiu inkstų nepakankamumu arba hemoglobinopatijomis, eritrocitai gali būti lėtai arba neviseškai sulizuojami arba jų visai neįmanoma lizuoti. Tokiu atveju rekomenduojama prieš dažant atskirti vienbranduoles ląsteles tankio gradiento būdu (pavyzdžiui, Ficollu) (7).

Pavyzdžiai ir nuorodos pateikti priede.

PREKIŲ ŽENKLAI

„Beckman Coulter“, stilizuotas logotipas ir kiti šiame dokumente nurodyti „Beckman Coulter“ gaminių ir prekių ženklai yra „Beckman Coulter, Inc.“ prekių ženklai arba registruotieji prekių ženklai Jungtinėse Amerikos Valstijose ir kitose šalyse.

Simbolių sutartiniai ženklai

Simbolių terminų žodynas pateikiamas interneto svetainėje beckman.com/techdocs (dokumento numeris B60062).

	Specifikációk
Specifititás	CD4
Klón	13B8.2
Hibridóma	NS1 x balb/c
Immunogén	Human thymocytes
Immunglobulin	IgG1
Faj	Egér
Tisztítás	Affinitáskromatográfia
Fluorokróm	R Phycoerythrin (PE)
Moláris arány	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ gerjesztés	488 nm
Kibocsátási csúcs	575 nm
Puffer	PBS pH 7,2 plusz 2 mg/mL BSA és 0,1% NaN ₃

IOTest Konjugált antitest CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 μ L/teszt

In vitro diagnosztikai használatra.

RENDELTETÉSSZERŰ HASZNÁLAT

Ez a fluorokrómmal konjugált antitest lehetővé teszi a CD4 antigént kifejező sejtpopulációk azonosítását és mennyiségi meghatározását humán biológiai mintákban, áramlási citométer segítségével.

MŰKÖDÉSI ELV

A vizsgálat azon alapul, hogy a specifikus monoklonális antitestek képesek-e kötődni a leukociták által expresszált antigén-determinánsokhoz.

A leukociták specifikus festése a mintának az IOTest reagenssel való inkubálásával történik. Az eritrocitákat ezután lízissel eltávolítják, és a leukocitákat, amelyekre nincs hatással ez a művelet, analizálni lehet áramlási citometriával.

Az áramlási citométer a sejtek fényszórását és fluoreszcenciáját méri. Ez lehetővé teszi a vizsgált populáció elhatárolását egy olyan elektronikus ablakon belül, amelyet a derékszögben szórt fény (oldalszóródás vagy SS) és a hegyes szögben szórt fény (előreszóródás vagy FS) intenzitását összehasonlító hisztogramon határoztak meg. Más, a citométer által mérték közül két paramétert kombináló hisztogramok használhatók kiegészítésként a kapuzási fázisban, a felhasználó által választott alkalmazástól függően.

Az elkülönített sejtek fluoreszcenciáját a rendszer elemzi a pozitívan festődött események megkülönböztetésére a nem festődöttöktől. Az eredmények kifejezése a pozitív események százalékos arányaként történik a kapuzás által regisztrált összes eseményhez képest.

PÉLDÁK KLINIKAI ALKALMAZÁSRA

Ez a reagens lehetővé teszi a CD4+ limfocita-sejtpopulációk jellemzését immunrendszeri rendellenességek esetén, ilyenek a következők: AIDS (1) és más immunhiányos állapotok, autoimmun-rendellenességek, autoimmun-betegségek (2), túlérzékenységi reakciók, vírusfertőzések, illetve az immunválasz helyreállítása csontvelő- vagy szervtranszplantáció után. A CD4+ populációk követése és fenotipizálása (3) a vesejtek malignus diszkráziái, például leukémia és limfóma esetében.

REAGENSEK

Koncentráció: Lásd a tételespecifikus Analízistanúsítványt a www.beckmancoulter.com weboldalon.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

- Ne használja a reagenst a lejáratí időn túl.
- Fagyasztani tilos.
- Használat előtt hagyja felmelegedni szobahőmérsékletre (18–25 °C).
- Minimalizálja a fényexpozíciót.
- Kerülje el a reagens mikrobiális kontaminációját, ebben az esetben hamis eredményeket kaphat.
- A nátrium-azidot (NaN₃) tartalmazó antitestoldatokat körültekintően kell kezelni. A terméket nem szabad lenyelni, és nem érintkezhet bőrrel, nyálkahártyával vagy a szemmel.
Sőt, savas közegben a nátrium-azid potenciálisan robbanékony nitrogén-hidrogénsavat képez. Ha ártalmatlanítani kell, javasolt a reagenst nagy mennyiségű vízzel hígítani a szennyvízcsatornába öntés előtt, hogy ne halmozódhasson fel nátrium-azid a fémcsövekben, és ne keletkezzen robbanásveszély.
- Minden vérmintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni, és óvatosan kell kezelni (azaz védőkesztyűt, köpenyt és szemüveget viselve).
- Soha ne pipettázzon szájjal, és kerülje a bőr és nyálkahártya mintákkal való érintkezését.
- A vércsőket és a kezeléshez használt, egyszer használatos anyagokat olyan ad hoc tartóedényben kell kidobni, amely égetésre szolgál.
- A reagensket és a hulladékot a helyi követelmények szerint kell ártalmatlanítani.

GHS SZERINTI VESZÉLYESSÉGI BESOROLÁS

Nincs veszélyes anyagként besorolva



A biztonsági adatlap elérhető a következő weboldalon: beckman.com/techdocs

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

A folyékony konjugátumokat 2 és 8 °C között, fénytől védve kell tárolni az üvegcsé felnyitása előtt és után is.

Stabilitás bontatlan üvegben: lásd a fiolán található címkét.

A felbontott fiola stabilitása: a reagens 180 napig stabil.

MINTÁK

A vénás vért steril, alvadástgátlóként EDTA sóját tartalmazó csövekbe kell gyűjteni.

A mintákat szobahőmérsékleten (18–25 °C között) kell tárolni, és nem szabad felrázni. A tesztminta vétele előtt a mintákat homogenizálni kell óvatos rázással.

A minták elemzését a vénaszúráshoz képest 24 órán belül el kell végezni.

A MINŐSÉGROMLÁS JELEI

A reagens fizikai megjelenésének bármilyen megváltozása megromlásra utalhat, és a reagenst nem szabad felhasználni.

Ha a csomagolás sérült, vagy ha a visszakapott adatok a teljesítmény változását mutatják, kérjük, vegye fel a kapcsolatot helyi terjesztőjével, vagy írjon a következő email címre: immuno-techsup@beckmancoulter.com

A CSOMAG TARTALMA

A nátrium-azid tartósítószer robbanékony vegyületeket képezhet a fém lefolyócsövekben. Lásd az alábbi NIOSH-közleményt: Explosive Azide Hazard (Robbanékony azidokkal kapcsolatos veszélyek) (76. 8. 16.).

Az azidvegyületek esetleges felhalmozódásának elkerülése érdekében a hígítatlan reagens szennyvízlefolyóba történő kiöntése után a szennyvízvezetékkel vízzel át kell öblíteni. A nátrium-azid ártalmatlanítását a vonatkozó helyi előírásoknak megfelelően kell végezni.

SZÜKSÉGES, DE A KÉSZLETTEL NEM SZÁLLÍTOTT ANYAGOK:

- Mintacsövek és a mintavételhez használt anyagok.
- Automata pipetták eldobható hegyekkel 20, 100 és 500 µL-hez.
- Műanyag hemolíziscsövek.
- Vörösvértesteket lizáló reagens, a lízis után mosási fázissal. Például: VersaLyse (Ref. A09777).
- Leukocitafixáló reagens. Például: IOTest 3 fixálóoldat (Ref. A07800).
- Izotipikus kontrol PE : IOTest reagens (Ref. A07796.).
- Puffer (PBS: 0,01 M nátrium-foszfát; 0,145 M nátrium-klorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automata keverő (vortex típusú).
- Áramlási citométer.

ELJÁRÁS VERSALYSE REAGENS ESETÉN

Megjegyzés: Az alábbi műveletek az alap alkalmazások esetén érvényesek. A minta és/vagy a VersaLyse térfogatok bizonyos Beckman Coulter alkalmazások esetén különbözőek lehetnek. Ilyen esetben kövesse az alkalmazás technikai leírásában található útmutatót.

Minden analizálandó mintához a teszt csővön felül egy kontroll cső is szükséges amiben a sejteket a választott specifikus festésnek megfelelő izotipikus kontrollal vannak összekeverve (Ref. A07796.).

1. Adjon 20 minden teszt csőhöz µL specifikus IOTest konjugált antitestet, majd 20 µL izotípus kontrollt minden egyes kontroll csőhöz.
2. Adjon 100 µL teszt mintát a mindkét csőhöz. Óvatosan vortexelje a kémcsöveket.
3. Inkubálja 15–20 percig szobahőmérsékleten (18–25 °C), fénytől védett helyen.
4. Ha szükséges, végezze el a vörösvértestek lízisét a lízis reagenshez kapott ajánlások alapján. Például: ha a VersaLyse (Ref. A09777) reagenst kívánja használni, lehetőség szerint kövesse a kísérő fixálós eljárást alkalmazó útmutatást, amelyben 1 mL "Fix-and-Lyse" frissen készített elegyet kell a mintához adni. Azonnal vortexelje egy másodpercig, és inkubálja szobahőmérsékleten, fénytől védve, 10 percig. Ha a minta nem tartalmaz vörösvértesteket adjon hozzá 2 mL PBS-t.
5. Centrifugálja 5 percig szobahőmérsékleten, 150 x g-vel.
6. Felszívás segítségével távolítsa el a felülúszót.
7. Reszuszpendálja a sejt pelletet 3 mL PBS-ben.
8. Ismétlje meg az 5. lépést.
9. Felszívással távolítsa el a felülúszót, és reszuszpendálja a sejt pelletet az alábbi reagenssel:
0,1% formaldehidet tartalmazó 0,5 mL vagy 1 mL PBS, ha a készítményt legfeljebb 24 óráig fogják tárolni. (0,1% formaldehidet tartalmazó PBS készítéséhez hígítson 12,5 µL IOTest 3 fixáló oldatot (REF A07800) a 10-szeresére 1 mL PBS-ben).
0,5 mL vagy 1 mL PBS formaldehid nélkül, ha a preparátum elemzése 2 órán belül fog történni.

Megjegyzés: A készítményeket fénytől védve, 2 és 8 °C között kell tárolni.

VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

Minden laboratóriumnak meg kell határoznia saját referenciaértékeit, a helyi populációból származó egészséges donorok eredményei alapján. Ennek során a kort, nemet és etnikai csoportot, valamint bármely egyéb, esetlegesen előforduló helyi különbséget figyelembe kell venni.

50 egészséges felnőtt teljes vérmintáját kezeltük laboratóriumunkban a fent leírt reagenssel. A vizsgált pozitív események megszámlálásából kapott eredményeket az alábbi táblázatok tartalmazzák.

Limfociták	Szám	Átlag (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monociták	Szám	Átlag (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

TELJESÍTMÉNY

A mérés működését jellemző adatokat a fent leírt módszerrel, 24 órás, előzőleg EDTA véralvadásgátlót tartalmazó steril csőbe gyűjtött vérmintán végzett mérések szolgáltatták. Az analízist 2 órával az immunfestés után kell elvégezni.

SPECIFICITÁS

A 13B8.2 monoklonális antitest egy, a CD4 antigén Ig-szerű V1 régiójában található epitópot ismer fel. A molekula extracitoplazmatikus régióit célzó mutációkat használó tanulmány kimutatta, hogy a 13B8.2 monoklonális antitest fixálását csak a 88 és/vagy 89 aminosavpozíciókat érintő mutációk érintették (4). A 13B8.2 monoklonális antitest gátolja a HIV-1 in vitro fixálását. A 13B8.2 monoklonális antitestet a 3. HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Oxford, Anglia, 1986 során jelölték ki a CD4 kimutatására (WS Code : 501, Section T) (5).

LABORATÓRIUMOK KÖZÖTTI ÁTJÁRTHATÓSÁG

Azonos napon, azonos citométert használva, 12 , a pozitív sejteket tartalmazó minták festődésének arányát mérő vizsgálatot végeztünk . A kapott eredményeket az alábbi táblázat foglalja össze:

Pozitív cél	Szám	Átlag (%)	SD	CV (%)
Limfociták CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearitás

A reagens festődésének linearitását az alábbiak szerint ellenőrizték. Egy pozitív sejtvonal ((HPBALL)) és egy negatív sejtvonal ((DAUDI)) sejteit különböző arányokban kevertek össze (a teljes sejtszámot állandónak tartva), oly módon, hogy a keverékben a pozitív/negatív sejtek aránya 0 és 100% között változott.

A keverékekből vett alikvotoknak a fenti eljárás szerinti festését követően a várt és a megfigyelt értékek közötti lineáris regressziót számították ki.

Specifititás	Lineáris Regresszió	Linearitás (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

KORLÁTOZÁSOK

1. Az áramlási citometria hamis eredményeket adhat, ha a citométert nem igazítják tökéletesen, ha nem kompenzálják megfelelően a fluoreszcenciaszivargást és ha a régiókat nem pozicionálják elég gondosan.
2. Javasolt mosási lépést is tartalmazó vörösvértest lízis módszer alkalmazása, mivel ezt a reagenst nem optimalizáltuk "mosás nélküli" lízis módszerekhez.
3. Pontos és megismételhető eredmények születnek, amennyiben az eljárásokat a műszaki tájékoztató szerint és a helyes laboratóriumi gyakorlattal összhangban végzik el.
4. A reagens konjugált antitestjét úgy kalibrálták, hogy a legjobb specifikus jel/nem specifikus jel arányt produkálja. Ezért fontos, hogy minden tesztnél betartsa a reagenstérfogát/mintatérfogát arányt.
5. Emelkedett leukocitaszám esetén hígítsa a vért annyi PBS hozzáadásával, hogy a fehérvérsejtek koncentrációja körülbelül 5×10^9 leukocita/L legyen (6).
6. Bizonyos betegségek, például súlyos veseelégtelenség vagy hemoglobinopátiák esetében előfordulhat, hogy a vörösvértestek lízise lassú, részleges, vagy akár lehetetlen. Ilyenkor javasolt a festés előtt a mononukleáris sejtek elkülönítése egy sűrűséggradiens alapján működő eljárással (ilyen például a Ficoll) (7).

A példákért és az irodalomjegyzékért lásd a Függelékét.

VÉDJEGYEK

A Beckman Coulter, a stilizált logó, valamint az itt említett Beckman Coulter termék- és szolgáltatásjegyek a Beckman Coulter, Inc. védjegyei vagy bejegyzett védjegyei az Amerikai Egyesült Államokban és más országokban.

Szimbólumok listája

A szimbólumok jegyzéke elérhető a következő weboldalon: beckman.com/techdocs (dokumentumszám: B60062)

	Specyfikacje
Swoistość	CD4
Klon	13B8.2
Hybrydoma	NS1 x balb/c
Immunogen	Human thymocytes
Immunoglobulina	IgG1
Gatunek	Mysz
Oczyszczanie	Chromatografia powinowactwa
Fluorochrom	R Phycoerythrin (PE)
Stosunek molowy	PE / Ig: 0,5 - 1,5
Wzbudzenie λ	488 nm
Pik emisji	575 nm
Bufor	PBS o pH 7,2 plus 2 mg/mL BSA i 0,1% NaN ₃

IOTest

Przeciwciało skoniugowane CD4-PE

[REF] A07751 100 tests; 2 mL, 20 μ L / test

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

PRZEZNACZENIE

To przeciwciało skoniugowane z fluorochromem pozwala na identyfikację i zliczanie populacji komórek ekspresujących antygen CD4 obecnych w próbkach biologicznych pochodzenia ludzkiego metodą cytometrii przepływowej.

ZASADA DZIAŁANIA

Ten test jest oparty na zdolności swoistych przeciwciał monoklonalnych do wiązania się z determinantami antygenowymi ekspresjonowanymi przez leukocyty.

Barwienie swoiste leukocytów jest wykonywane poprzez inkubację próbki z odczynnikiem IOTest. Krwinki czerwone są następnie usuwane poprzez lizę, a leukocyty, na które ta liza nie wpływa, są analizowane metodą cytometrii przepływowej.

Cytometr przepływowy mierzy rozpraszanie światła i fluorescencję komórek. Umożliwia to odgraniczenie populacji zainteresowania w elektronicznym oknie zdefiniowanym na histogramie, który koreluje ortogonalne rozpraszanie światła (rozpraszanie boczne — Side Scatter, w skrócie SS) i rozpraszanie światła pod wąskim kątem (rozpraszanie do przodu, Forward Scatter, w skrócie FS). Na etapie bramkowania, w zależności od zastosowania wybranego przez użytkownika, można używać innych histogramów łączących dwa z różnych parametrów dostępnych w cytometrze.

Fluorescencja odgraniczonych komórek jest analizowana w celu odróżnienia zdarzeń barwionych dodatkowo od zdarzeń nieulegających barwieniu. Wyniki są wyrażane jako odsetek zdarzeń dodatnich względem wszystkich zdarzeń zarejestrowanych poprzez bramkowanie.

PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ KLINICZNYCH

Niniejszy odczynnik umożliwia charakteryzowanie populacji limfocytów CD4+ w zaburzeniach działania układu immunologicznego: AIDS (1) i innych niedoborach odporności, zaburzeniach autoimmunologicznych (2), reakcjach nadwrażliwości, zakażeniach wirusowych, przywracaniu odpowiedzi immunologicznej po przeszczepieniu szpiku kostnego i/lub narządu. Kontrola i fenotypowanie populacji komórek CD4+ (3) w złośliwych dyskracjach krwi, takich jak białaczki i chłoniaki.

ODCZYNNIKI

Stężenie: patrz certyfikat analizy dla partii na stronie www.beckmancoulter.com.

OSTRZEŻENIE I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Nie używać odczynników po upływie daty ważności.
2. Nie zamrażać.
3. Przed użyciem odczekać, aż osiągnie temperaturę pokojową (18–25°C).
4. Maksymalnie ograniczyć narażenie na działanie światła.
5. Nie dopuścić do skażenia mikrobiologicznego odczynników, gdyż może to spowodować uzyskanie fałszywych wyników.
6. Z roztworami przeciwciał zawierającymi azydek sodu (NaN₃) należy postępować ostrożnie. Nie spożywać i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą, błoną śluzową oraz oczami.
Ponadto w środowisku kwaśnym azydek sodu może tworzyć potencjalnie niebezpieczny kwas azotowodorowy. W przypadku konieczności usunięcia zalecane jest rozcieńczenie odczynnika w dużej objętości wody przed waniem go do kanalizacji, aby uniknąć gromadzenia się azydki sodu w metalowych rurach i uniknąć ryzyka wybuchu.
7. Wszystkie próbki krwi należy uważać za potencjalnie zakaźne i obchodzić się z nimi ostrożnie (w szczególności nosić ochronne rękawice, fartuchy i okulary).
8. Nie pipetować ustami. Unikać wszelkiego kontaktu próbek ze skórą, śluzówkami i oczami.
9. Probówki przeznaczone na krew i materiały jednorazowego użytku używane podczas procedury należy usuwać do pojemników ad hoc przeznaczonych do spalania.
10. Odczynniki i odpady należy usuwać zgodnie z wymogami lokalnymi.

KLASYFIKACJA ZAGROŻEŃ WG GHS

Produkt nie został sklasyfikowany jako niebezpieczny

MAGAZYNOWANIE I STABILNOŚĆ

Koniugaty w formie ciekłej muszą być przed otwarciem fiołki przechowywane w temperaturze 2 – 8°C, bez dostępu światła.

Stabilność zamkniętej fiołki: patrz data ważności na fiołce.

Stabilność otwartej fiołki: odczynnik zachowuje stabilność przez 180 dni.

PRÓBKİ

Krew żylną należy pobierać do sterylnych probówek zawierających antykoagulant w postaci soli EDTA.

Próbki należy przechowywać w temperaturze pokojowej (18–25°C), bez wytrząsania. Przed pobraniem próbki do testu należy uzyskać jednorodną mieszaninę poprzez delikatne mieszanie.

Próbki muszą zostać zbadane w ciągu 24 godzin od pobrania krwi żyłnej przez nakłucie.

OZNAKA POGORSZENIA WŁAŚCIWOŚCI

Wszelkie zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników mogą wskazywać na pogorszenie właściwości — odczynników takich nie należy używać.

W przypadku naruszenia opakowania lub jeśli uzyskane dane wskazują możliwość zmian dotyczących działania, należy skontaktować się z lokalnym dystrybutorem lub przesłać wiadomość na poniższy adres e-mail:

ZAWARTOŚĆ

Środek konserwujący, azydek sodu, może tworzyć związki wybuchowe w metalowych rurach kanalizacyjnych. Patrz NIOSH Bulletin (Biuletyn instytutu NIOSH): Explosive Azide Hazard (Niebezpieczeństwo wybuchu azydku) (16.8.76).

Po usunięciu nierozcieńczonego odczynnika należy przepłukać rury ściekowe wodą, aby uniknąć gromadzenia się azydków. Azydek sodu musi być usuwany zgodnie z odpowiednimi przepisami lokalnymi.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE Z ZESTAWEM:

- Probówki do pobierania próbek i materiały wymagane do pobierania próbek.
- Pipety automatyczne z jednorazowymi końcówkami na 20, 100 i 500 µL.
- Probówki z tworzywa sztucznego przeznaczone do hemolizy.
- Odczynnik do lizy erytrocytów, z etapem przemylwania po etapie lizy. Przykład: VersaLyse (nr ref. A09777).
- Odczynnik do utrwalania limfocytów. Przykład: Roztwór utrwalający IOTest 3 (nr ref. A07800).
- Kontrola izotypowa PE : IOTest reagent (Ref. A07796.).
- Bufor (PBS: 0,01 M fosforan sodu; 0,145 M chlorek sodu; pH 7,2).
- Wirówka.
- Mieszadło automatyczne (typu worteks).
- Cytometr przepływowy.

PROCEDURA Z ODCZYNNIKIEM VERSALYSE

Uwaga: Poniższa procedura obowiązuje w standardowych zastosowaniach. Niektóre zastosowania Beckman Coulter mogą wymagać innych objętości próbek i/lub odczynnika VersaLyse. W takim przypadku postępować zgodnie z instrukcją zamieszczoną w instrukcji zastosowania.

Dla każdej analizowanej próbki oprócz próbki testowej wymagana jest jedna próbka kontrolna, w której komórki mieszane są w obecności kontroli izotypowej (Odn. A07796.).

1. Dodać 20 µL swoistego przeciwciała skoniugowanego IOTest do każdej próbki i 20 µL kontroli izotypowej do każdej próbki kontrolnej.
2. Dodać po 100 µL próbki do obu probówek. Łagodnie wymieszać probówki wytrząsarką Vortex.
3. Inkubować przez 15–20 minut w temperaturze pokojowej (18–25°C), chroniąc przed światłem.
4. Następnie przeprowadzić lizę erytrocytów (jeśli wymagana), postępując zgodnie z instrukcją stosowanego odczynnika do lizy. Na przykład, jeśli chcesz użyć odczynnika VersaLyse (Odn. A09777), zapoznaj się z ulotką i najlepiej zastosuj procedurę o nazwie „z równoczesnym utrwalaniem”, polegającą na dodaniu 1 mL świeżo przygotowanego roztworu „Fix-and-Lyse”. Natychmiast wymieszać przez sekundę mikserem Vortex i inkubuj przez 10 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Jeśli próbka nie zawiera czerwonych krwinek, dodaj 2 mL PBS.
5. Wirować przez 5 minut przy 150 x g w temperaturze pokojowej.
6. Usunąć supernatant poprzez zasysanie.
7. Zawiesić osad komórkowy w 3 mL PBS.
8. Powtórzyć etap 5.
9. Usunąć supernatant poprzez zasysanie i ponownie zawiesić osad komórkowy w:
0,5 mL lub 1 mL PBS oraz 0,1% formaldehydu, jeśli preparaty mają być przechowywane przez czas krótszy niż 24 godz. (0,1% roztwór formaldehydu w PBS można uzyskać, rozcieńczając 12,5 µL odczynnika utrwalającego IOTest 3 (REF A07800) w stężeniu 10X w 1 mL PBS).
0,5 mL lub 1 mL PBS bez formaldehydu, jeśli preparaty zostaną poddane analizie w ciągu 2 godz.

Uwaga: Niezależnie od sytuacji preparaty należy przechowywać w temperaturze 2–8°C, chroniąc je przed światłem.

WARTOŚCI OCZEKIWANE

Każde laboratorium musi stworzyć listę wartości odniesienia w oparciu o grupę zdrowych dawców z lokalnej populacji. Należy przy tym uwzględnić wiek, płeć i grupę etniczną oraz wszelkie dodatkowe potencjalne różnice regionalne.

W naszych laboratoriach, z wykorzystaniem opisanego powyżej odczynnika przeprowadzono badania próbek pełnej krwi 50 zdrowych osób dorosłych. Uzyskane wyniki zliczeń istotnych zdarzeń pozytywnych z odczynnikiem podano w poniższych tabelach :

Limfocyty	Liczba	Średnia (%)	SD	WZ (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocyty	Liczba	Średnia (%)	SD	WZ (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

WYDAJNOŚĆ

Dane wydajności uzyskano z użyciem procedury opisaną powyżej, na 24-godzinnych próbkach krwi zebranych uprzednio do sterylnych probówek z solą EDTA jako antykoagulantem. Analizę wykonuje się w ciągu 2 godzin od wybarwienia immunologicznego.

SWOISTOŚĆ

Przeciwciała monoklonalne (mAb) 13B8.2 rozpoznaje epitop umieszczony na regionie V1, typu Ig, antygeny CD4. Badanie mapy epitopowej za pomocą mutacji kierowanych na pozakomórkowe regiony cząsteczki wykazało, że wiązanie mAb 13B8.2 hamowane było tylko w przypadku mutacji obejmujących pozycje 88 i/lub 89 (4). MAb 13B8.2 hamuje in vitro wiązanie HIV-1. Przeciwciała 13B8.2 zostało przypisane do CD4 podczas konferencji 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, która odbyła się w Oxfordzie, Anglia, w 1986 roku (kod WS: 501, sekcja: T) (5).

ODTWARZALNOŚĆ WEWNĄTRZLABORATORYJNA

Jednego dnia, za pomocą jednego cytometru, przeprowadzono 12 pomiarów procentu wybarwienia pozytywnego obiektu. Uzyskane wyniki podsumowuje tabela poniżej:

Dodatnie docelowe komórki	Liczba	Średnia (%)	SD	WZ (%)
Limfocyty CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Liniowość

W celu sprawdzenia liniowości barwienia odczynnikiem zmieszano w różnych proporcjach linie komórek dodatnich ((HPBALL)) i ujemnych ((DAUDI)), ze stałą liczbą sumaryczną komórek w taki sposób, by uzyskać stosunki komórek dodatnich i ujemnych liniowo w zakresie od 0 do 100%.

Porcje wybarwiono, stosując opisaną wyżej procedurę, a następnie wyliczono regresję liniową wartości spodziewanych i doświadczalnych.

Swoistość	Regresja liniowa	Liniowość (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

ORGANICZENIA

1. Wyniki cytometrii przepływowej mogą być zafałszowane, jeśli osiowanie cytometru nie było dokładne, przepuszczona fluorescencja nie została prawidłowo skompensowana, a regiony nie zostały starannie upozycjonowane.
2. Zaleca się stosowanie techniki lizy czerwonych krwinek z etapem płukania, ponieważ odczynnik nie został zoptymalizowany do technik lizy bez płukania.
3. Uzyskane wyniki będą dokładne i odtwarzalne pod warunkiem, że stosowane będą procedury zgodne z informacjami zawartymi w ulotce z danymi technicznymi oraz z dobrymi praktykami laboratoryjnymi.
4. Skoniugowane przeciwciała zawarte w tym odczynniku zostało skalibrowane tak, aby zapewniać najlepszy stosunek sygnału swoistego do nieswoistego. Dlatego ważne jest przestrzeganie stosunku objętości odczynnika do objętości próbki w każdym teście.
5. W przypadku hiperleukocytozy należy rozcieńczyć krew w PBS, aby uzyskać wartość w przybliżeniu 5×10^9 leukocytów/L (6).
6. W niektórych stanach chorobowych, takich jak ciężka niewydolność nerek lub hemoglobinopatie, liza krwinek czerwonych może być powolna, niepełna lub nawet niemożliwa. W takich przypadkach przed barwieniem zalecane jest wyizolowanie komórek jednojądrzastych na gradiencie gęstości (na przykład Ficoll) (7).

Przykłady i piśmiennictwo można znaleźć w załączniku.

ZNAKI TOWAROWE

Beckman Coulter, stylizowane logo oraz wymienione w tym dokumencie znaki produktów i usług firmy Beckman Coulter są znakami towarowymi lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Beckman Coulter, Inc. w Stanach Zjednoczonych i innych krajach.

Legenda symboli

Słowniczek symboli jest dostępny pod adresem beckman.com/techdocs (numer dokumentu B60062)

	Specifikace
Specificita	CD4
Klon	13B8.2
Hybridom	NS1 x balb/c
Imunogen	Human thymocytes
Imunoglobulin	IgG1
Druhy	Myš
Purifikace	Afinitní chromatografie
Fluorochrom	R Phycoerythrin (PE)
Molární poměr	PE/Ig: 0,5 - 1,5
Excitace λ	488 nm
Emisní vrchol	575 nm
Pufr	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA a 0,1 % NaN ₃

IOTest

Konjugovaná protilátka CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 ml, 20 μ l/test

Pouze pro diagnostiku *in vitro*

URČENÉ POUŽITÍ

Tato protilátka konjugovaná s fluorochromem umožňuje metodou průtokové cytometrie identifikovat a určit počet buněk v populacích, které v lidských biologických vzorcích exprimují antigen CD4.

PRINCIP

Tento test je založen na schopnosti monoklonálních protilátek specificky se vázat na antigenní determinanty exprimované na leukocytech.

Specifické značení leukocytů se provádí inkubováním vzorku s reagentií IOTest. Červené krvinky jsou poté odstraněny provedením lýzy a bílé krvinky, jež tímto procesem nejsou ovlivněny, jsou analyzovány na průtokovém cytometru.

Průtokový cytometr měří difúzi světla a fluorescenci buněk. Umožňuje oddělit zkoumanou populaci v rámci elektronického okna definovaného na histogramu, který je v korelaci s ortogonální difúzí světla (kolmý rozptyl) a s difúzí světla v úzkém úhlu (přímý rozptyl). Jako podporu ve fázi gatování lze, v závislosti na aplikaci zvolené uživatelem, použít další histogramy s kombinací dvou různých parametrů, které jsou v cytometru k dispozici.

Fluorescence oddělených buněk je analyzována s cílem odlišit pozitivně obarvené události od neobarvených. Výsledky jsou vyjádřeny jako procentní podíl pozitivních událostí ze všech událostí zjištěných gatováním.

PŘÍKLADY KLINICKÝCH APLIKACÍ

Tato reagentie umožňuje charakterizaci populací lymfocytických buněk CD4+ pro poruchách imunitního systému: AIDS (1) a jiná selhání imunity, poruchy autoimunitního systému (2), hypersenzitivní reakce, virové infekce, obnova reakce imunitního systému po transplantaci kostní dřeně či orgánů. Následný postup a fenotypizace populací buněk CD4+ (3) u diskazií maligní krve a lymfomů.

REAGENCIE

Koncentrace: Viz osvědčení o analýze pro danou šarži na stránce www.beckmancoulter.com.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Reagentii nepoužívejte po datu expirace.
2. Nezmrazujte.
3. Před použitím nechte vytemperovat na laboratorní teplotu (18–25 °C).
4. Minimalizujte expozici světlu.
5. Zabraňte mikrobiologické kontaminaci reagentií, jinak mohou být výsledky chybné.
6. S roztoky protilátek obsahujícími azid sodný (NaN₃) je třeba manipulovat opatrně. Neužívejte vnitřně a zabraňte veškerému kontaktu s pokožkou, sliznicemi a očima.
V kyselém prostředí může azid sodný navíc vytvářet potenciálně nebezpečnou kyselinu azidodvodíkovou. Při likvidaci se doporučuje před vylitím do odpadu reagentii zředit velkým objemem vody, aby nedocházelo k hromadění nebezpečného azidu sodného v kovovém potrubí a předešlo se tak riziku exploze.
7. Všechny vzorky krve je nutno považovat za potenciálně infekční a je nutné manipulovat s nimi opatrně (zvláště: používat ochranné rukavice, pláště a brýle).
8. Nikdy nepipetujte ústy a vyvarujte se kontaktu vzorků s pokožkou, sliznicemi a očima.
9. Zkumavky s krví a jednorázový materiál určený pro manipulaci je třeba likvidovat v kontejnerech ad hoc určených ke spálení.
10. Reagentie a odpad by měly být odstraňovány v souladu s místními požadavky.

KLASIFIKACE NEBEZPEČÍ PODLE GHS

Není klasifikované jako nebezpečné



Bezpečnostní list je k dispozici na adrese beckman.com/techdocs

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Konjugované protilátky ve formě roztoku musí být uchovávány při 2 až 8 °C bez přístupu světla předtím i poté, co byla lahvička otevřena.

Stabilita uzavřené lahvičky: viz datum expirace na lahvičce.

Stabilita již jednou otevřené lahvičky: reagentie je stabilní po dobu 180 dní.

VZORKY

Vzorky žilní krve musejí být odebrány do sterilních zkumavek obsahujících sůl EDTA jako antikoagulační činidlo.

Vzorky by měly být uchovávány při laboratorní teplotě (18–25 °C) a neměly by se protřepávat. Vzorek by měl být před odebráním vzorku k testování homogenizován mírným promícháním.

Vzorky je nutné analyzovat do 24 hodin od venepunkce.

ZNÁMKY ZHORŠENÍ KVALITY

Jakákoli změna fyzického vzhledu reagentie může znamenat jejich znehodnocení a taková reagentie by se neměla používat.

V případě poškození obalu nebo vykazují-li získaná data změnu účinnosti metody, kontaktujte svého místního distributora nebo použijte následující e-mailovou adresu:

OBSAH

Konzervační látka azid sodný může v kovovém odpadním potrubí vytvářet výbušné sloučeniny. Viz bulletin NIOSH: Explosive Azide Hazard (Nebezpečí výbušných azidů) (16.8.76).

Po vypuštění neředěné reagentie propláchněte odpadní potrubí vodou, aby se v něm nehromadily azidové sloučeniny. Likvidace azidu sodného musí být prováděna podle příslušných místních předpisů.

MATERIÁLY POTŘEBNÉ, ALE NEDODANÉ SE SOUPRAVOU:

- Zkumavky na odběr vzorků a materiál potřebný k odběru vzorků.
- Automatické pipety s jednorázovými špičkami pro 20, 100 a 500 µl.
- Plastové zkumavky na hemolýzu.
- Reagentie pro lýzu červených krvinek s fází promývání po lýze. Například: VersaLyse (ref. A09777).
- Reagentie pro fixaci leukocytů. Například: Fixační roztok IOTest 3 (ref. A07800).
- Izotypová kontrola PE : reagentie řady IOTest (Ref. A07796.).
- Pufr (PBS: 0,01 M fosforečnan sodný; 0,145 M chlorid sodný; pH 7,2).
- Odstředivka.
- Automatické míchadlo (typu vortex).
- Průtokový cytometr.

POSTUP S REAGENCIÍ VERSALYSE

Pozn. Níže popsaná metoda je vhodná pro standardní aplikace. Vzorky a/nebo objemy roztoku VersaLyse se v určitých aplikacích Beckman Coulter mohou lišit. V těchto případech dodržujte pokyny uvedené v technickém návodu konkrétní aplikace.

Pro každý analyzovaný vzorek je třeba kromě testové zkumavky připravit ještě jednu zkumavku kontrolní, kde jsou buňky smíchány s izotypovou kontrolou (Ref. A07796.).

1. Přidejte 20 µl specifické konjugované protilátky IOTest ke každé testované zkumavce a 20 µl izotypické kontroly ke každé kontrolní zkumavce.
2. Do obou zkumavek přidejte 100 µl testovaného vzorku. Zkumavky jemně promíchejte na vortexu.
3. Provádějte inkubaci po dobu 15 až 20 minut při laboratorní teplotě (18–25 °C), chraňte před světlem.
4. Pokud je to nutné, proveďte lýzu červených krvinek. Dodržujte doporučení pro lyzační roztok, který používáte. Např. při použití roztoku VersaLyse (Ref. A09777) je podle příbalové informace nejvhodnější provést metodu s fixací doprovázející lýzu vzorku, která sestává z přidání 1 ml předem připravené směsi pro fixaci a lýzu ("Fix-and-Lyse"). Vzorek ihned promíchejte jednu vteřinu na vortexu a inkubujte 10 minut při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Jestliže vzorek neobsahuje erytrocyty, přidejte 2 ml PBS.
5. Odstředějte 5 minut při 150 x g při laboratorní teplotě.
6. Supernatant odsajte.
7. Resuspendujte buněčnou peletu pomocí 3 ml PBS.
8. Opakujte krok 5.
9. Odsajte supernatant a resuspendujte buněčnou peletu pomocí:
0,5 ml nebo 1 ml PBS plus 0,1 % formaldehydu, pokud mají být preparáty uchovány po dobu kratší než 24 hodin. (0,1 % formaldehyd PBS lze získat ředěním 12,5 µl fixačního roztoku IOTest 3 (REF A07800) při koncentraci 10X na 1 ml PBS).
0,5 ml nebo 1 ml PBS bez formaldehydu, pokud mají být preparáty analyzovány do 2 hodin.

Poznámka: Ve všech případech uchovávejte preparáty při teplotě mezi 2 a 8 °C a chraňte je před světlem.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř musí shromáždit vlastní referenční hodnoty založené na skupině zdravých dárců vybraných z místní populace. Úvahu je třeba brát věk, pohlaví a etnickou příslušnost dárců, stejně jako další potenciální regionální rozdíly.

V našich laboratořích byla plná krev získaná od 50 zdravých dospělých dárců inkubována s výše uvedenou reagentií. Získané výsledky, které vyjadřují zastoupení částic pozitivně označených touto reagentií, jsou uvedeny v následující tabulce :

Lymfocyty	Počet	Průměr (%)	SD (směrodatná odchylka)	VK (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocyty	Počet	Průměr (%)	SD (směrodatná odchylka)	VK (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Data pro stanovení charakteristiky se získávají na základě výše uvedeného postupu z 24 hodin starého krevního vzorku odebraného do sterilních zkumavek, obsahujících sůl EDTA jako antikoagulační činidlo. Analýza se provádí během 2 hodin po imunologickém barvení.

SPECIFICITA

Monoklonální protilátka (mAb) 13B8.2 rozeznává na molekule CD4 epitop V1 domény imunoglobulinového typu ("Ig-like"). Při mapování epitopů za použití cílených mutací v extracelulární části molekuly bylo zjištěno, že k porušení vazby monoklonální protilátky 13B8.2 došlo pouze v případě, kdy byl mutací ovlivněn 88. a/nebo 89. aminokyselinový zbytek (4). Monoklonální protilátka 13B8.2 inhibuje in vitro vazbu HIV-1. Specifita rozeznání CD4 monoklonální protilátkou 13B8.2 byla uznána v rámci 3. konference o lidských leukocytárních diferenciacích antigenech ("3rd HLDA Workshop"), která se konala v roce 1986 v Oxfordu v Anglii (WS kód: 501, sekce T) (5).

REPRODUKOVATELNOST V RÁMCI LABORATOŘE

Bylo provedeno 12 stanovení procentuálního zastoupení pozitivních buněk na jednom vzorku. Měření proběhlo v jeden den na tomtéž průtokovém cytometru. Získané výsledky shrnuje následující tabulka:

Pozitivní nosič	Počet	Průměr (%)	SD (směrodatná odchylka)	VK (%)
Lymfocyty CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearita

K testování linearity stanovení při použití této reagentie byly v různých poměrech smíchány buňky pozitivní buněčné linie ((HPBALL)) a buňky negativní buněčné linie ((DAUDI)) tak, aby konečný počet buněk ve směsi byl konstantní a aby se poměr buněk pozitivní linie / negativní linie pohyboval v rozmezí 0 – 100 %.

Alikvoty byly zpracovány výše popsaným způsobem a byla provedena lineární regrese pro očekávané a získané hodnoty.

Specifita	Linear regression	Linearita (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

OMEZENÍ

1. Průtoková cytometrie může přinést falešné výsledky, pokud cytometr nebyl dokonale seřízen, pokud nebyly správně kompenzovány úniky fluorescence a pokud oblasti nebyly pečlivě umístěny.
2. Reagentie dosud nebyla optimalizována pro použití v lyzační technice bez promývání, proto je vhodnější použít metodu lýzy s následným promýváním vzorku.
3. Přesných a reprodukovatelných výsledků bude dosaženo, pokud jsou použité postupy v souladu s technickým příbalovým letákem a se správnou laboratorní praxí.
4. Konjugovaná protilátka této reagentie je kalibrována tak, aby poskytovala nejlepší možný poměr specifického signálu k nespecifickému signálu. Proto je důležité při každém testu dodržovat poměr objemu reagentie a objemu vzorku.
5. V případě hyperleukocytózy naředte krev v přípravku PBS tak, aby byla dosažena hodnota přibližně 5×10^9 leukocytů/l (6).
6. U určitých chorob, například závažného selhání ledvin či hemoglobinopatií, se může stát, že lýza červených krvinek bude probíhat pomalu, nedokončí se, nebo dokonce nebude možná. V tomto případě se před značením doporučuje izolovat mononukleární buňky s použitím hustotního gradientu (např. Ficoll) (7).

Příklady a reference jsou uvedeny v příloze.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Beckman Coulter, stylizované logo a známky produktů a služeb společnosti Beckman Coulter uvedené v tomto dokumentu jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Beckman Coulter, Inc. ve Spojených státech amerických a dalších zemích.

Klíč k symbolům

Slovníček symbolů je k dispozici na adrese beckman.com/techdocs (číslo dokumentu B60062)

	Špecifikácie
Špecifickosť	CD4
Klon	13B8.2
Hybridóm	NS1 x balb/c
Imunogén	Human thymocytes
Imunoglobulín	IgG1
Druhy	Myš
Purifikácia	Afinitná chromatografia
Fluorochróm	R Phycoerythrin (PE)
Molárny pomer	PE/Ig: 0,5 - 1,5
Excitácia λ	488 nm
Vrchol emisií	575 nm
Úložný roztok	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA a 0,1 % NaN ₃

IOtest

Konjugovaná protilátka CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 ml, 20 µl/test

Na diagnostické použitie *in vitro*

URČENÉ POUŽITIE

Táto protilátka konjugovaná s fluorochromom umožňuje metódou prietokovej cytometrie identifikovať a určiť počet buniek v populáciách, ktoré v ľudských biologických vzorkách exprimujú antigén CD4

PRINCÍP

Tento test je založený na schopnosti špecifických monoklonálnych protilátok viazať sa na antigénne determinanty exprimované na leukocytoch.

Špecifické farbenie leukocytov sa vykoná inkubáciou vzorky s činidlom IOtest. Červené krvinky sa následne odstránia lýzou a leukocyty, na ktoré tento postup nemá vplyv, sa analyzujú prietokovou cytometriou.

Prietokový cytometer meria rozptyl svetla a fluorescenciu buniek. Umožňuje vymedzenie požadovanej populácie v rámci elektronického okna zadefinovaného v histograme znázorňujúcom koreláciu ortogonálneho rozptylu svetla (bočný rozptyl, SS) a rozptylu svetla v úzkom uhle (predný rozptyl, FS). Ostatné histogramy obsahujúce kombináciu dvoch rozličných parametrov dostupných na cytometri možno použiť na podporu vo fáze gatingu v závislosti od aplikácie zvolenej používateľom.

Fluorescencia vymedzených buniek sa analyzuje s cieľom odlíšiť pozitívne sfarbené udalosti od nesfarbených. Výsledky sú vyjadrené ako percento pozitívnych udalostí vzhľadom na všetky udalosti zaznamenané gatingom.

PRÍKLADY KLINICKÝCH APLIKÁCIÍ

Toto činidlo umožňuje vykonávať charakterizáciu populácií lymfocytových buniek CD4⁺ pri ochoreniach imunitného systému: AIDS (1) a iných druhoch imunitnej nedostatočnosti, autoimunitných ochoreniach (2), hypersenzitívnych reakciách, vírusových infekciách, obnovení imunitnej odpovede po transplantácii kostnej drene alebo orgánov. Pri sledovaní a fenotypizácii populácií buniek CD4⁺ (3) pri malígnych krvných dyskráziách, ako sú leukémie alebo lymfómy.

ČINIDLÁ

Koncentrácia: Pozrite certifikát analýzy špecifický pre danú šaržu, ktorý nájdete na www.beckmancoulter.com.

VÝSTRAHA A OPATRENIA

- Činidlo nepoužívajte po dátume expirácie.
- Nezamrazujte.
- Pred použitím nechajte zahriať na izbovú teplotu (18 – 25 °C).
- Minimalizujte vystavenie svetlu.
- Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii činidiel, inak môže dôjsť k falošným výsledkom.
- S roztokmi protilátok obsahujúcimi azid sodný (NaN₃) by sa malo zaobchádzať opatrne. Nepožívajte ich a vyhýbajte sa akémukoľvek kontaktu s kožou, sliznicami a očami.
V médiu s obsahom kyseliny môže navyše azid sodný vytvárať potenciálne nebezpečnú kyselinu azidovodíkovú. Ak je činidlo potrebné zlikvidovať, odporúča sa ho pred vylitím do kanalizácie zriediť vo veľkom objeme vody, aby sa predišlo riziku explózie v dôsledku hromadenia azidu sodného v kovovom potrubí.
- Všetky vzorky krvi sa musia považovať za potenciálne infekčné, a preto sa s nimi musí narábať opatrne (predovšetkým: používajte ochranné rukavice, plášte a okuliare).
- Nikdy nepipetujte ústami a vyvarujte sa kontaktu vzorky s pokožkou, sliznicami a očami.
- Skúmavky na krv a jednorazový materiál používané pri manipulácii sa musia zlikvidovať do schválených nádob určených na spálenie.
- Činidlá a odpad by sa mali eliminovať v súlade s miestnymi požiadavkami.

KLASIFIKÁCIA RIZÍK PODĽA GHS

Nie je klasifikované ako nebezpečné



Bezpečnostný list je dostupný na adrese beckman.com/techdocs

SKLADOVANIE A STABILITA

Konjugované protilátky vo forme roztoku musia byť uchovávané pri 2 až 8 °C bez prístupu svetla predtým i potom, čo bola fľaštička otvorená.

Stabilita zatvorenej fľaštičky: pozri dátum expirácie na fľaštičke.

Stabilita otvorenej fľaštičky: činidlo je stabilné 180 dní.

VZORKY

Vzorky žilovej krvi musia byť odobraté do sterilných skúmaviek, ktoré obsahujú soľ EDTA ako antikoagulačné činidlo.

Vzorky by sa mali uchovávať pri izbovej teplote (18 – 25 °C) a nemalo by sa nimi triasť. Vzorky by sa mali pred odobratím testovacej vzorky homogenizovať jemným pretrepaním.

Vzorky sa musia analyzovať do 24 hodín od odberu.

ZNÁMKY ZNEHODNOTENIA

Akákoľvek zmena fyzického vzhľadu činidla môže svedčiť o zhoršení kvality a takéto činidlo by sa nemalo používať.

Ak je poškodené balenie alebo ak získané údaje poukazujú na zmenu funkčnosti, obráťte sa na miestneho distribútora alebo použite nasledujúcu e-mailovú adresu:

OBSAH

Konzervačné činidlo azid sodný môže v kovovej kanalizačnej sieti vytvárať výbušné zlúčeniny. Pozrite si informačný bulletin NIOSH: Explosive Azide Hazard (Nebezpečenstvo výbušného azidu) (16. 8. 76).

Aby nedošlo k možnému nahromadeniu azidových zlúčenín, po likvidácii neriedeného činidla vypláchnite potrubie vodou. Likvidácia azidu sodného musí prebiehať v súlade s príslušnými miestnymi predpismi.

POTREBNÝ MATERIÁL, KTORÝ NIE JE SÚČASŤOU SÚPRAVY:

- Vzorkovacie skúmavky a materiál potrebný na vzorkovanie.
- Automatické pipety s jednorazovými špičkami na dávkovanie objemov 20, 100 a 500 µl.
- Plastové hemolytické skúmavky.
- Činidlo na lýzu červených krviniek s umývacou fázou po lýze. Napríklad: VersaLyse (Ref. A09777).
- Činidlo na fixáciu leukocytov. Napríklad: fixačný roztok IOTest 3 (Ref. A07800).
- Izotypová kontrola PE : reagentie rady IOTest (Ref. A07796.).
- Tlmiaci roztok (PBS: fosforečnan sodný 0,01 M; chlorid sodný 0,145 M; pH 7,2).
- Centrifúga.
- Automatické miešadlo (typ Vortex).
- Prietokový cytometer.

POSTUP S ČINIDLOM VERSALYSE

POZN. : Nižšie popísaná metóda je vhodná pre štandardné aplikácie. Vzorky a/alebo objemy roztoku VersaLyse sa v určitých aplikáciách Beckman Coulter môžu líšiť. V týchto prípadoch dodržujte pokyny uvedené v technickom návode konkrétnej aplikácie. Pre každú analyzovanú vzorku je potrebné

Pre každú analyzovanú vzorku je treba okrem testovej skúmavky pripraviť ešte jednu skúmavku kontrolnú, kde sú bunky zmiešané s izotypovou kontrolou (Ref. A07796.).

1. Do každej testovej skúmavky pridajte 20 µl špecifickej konjugovanej protilátky IOTest a do každej kontrolnej skúmavky 20 µl izotypickej kontroly.
2. Do oboch skúmaviek pridajte 100 µl testovanej vzorky. Skúmavky jemne premiešajte na vortexe.
3. Inkubujte 15 až 20 minút pri izbovej teplote (18 – 25 °C) bez prístupu svetla.
4. Pokiaľ je to nutné, vykonajte lýzu červených krviniek. Dodržujte odporúčanie pre lyzačný roztok, ktorý používate. Napr. pri použití roztoku VersaLyse (Ref. A09777) je podľa príbalovej informácie najvhodnejšie vykonať metódu s fixáciou sprevádzajúcou lýzu vzorky, ktorá pozostáva z prídania 1 ml predom pripravenej zmesi na fixáciu a lýzu ("Fix-a-Lyse"). Vzorku ihneď premiešajte jednu sekundu na vortexe a inkubujte 10 minút pri laboratórnej teplote bez prístupu svetla. Ak vzorka neobsahuje erytrocyty, pridajte 2 ml PBS.
5. Odstredujte 5 minút pri 150 x g pri izbovej teplote.
6. Nasatím odoberte supernatant.
7. Resuspendujte bunkový pelet použitím 3 ml PBS.
8. Zopakujte krok 5.
9. Odsajte supernatant a resuspendujte bunkový pelet použitím:

0,5 ml alebo 1 ml PBS plus 0,1 % formaldehydu, ak sa preparáty budú skladovať kratšie ako 24 hodín. (0,1 % roztok PBS s formaldehydom získate zriedením 12,5 µl fixačného roztoku IOTest 3 (REF A07800) s koncentráciou 10X v 1 ml PBS).

0,5 ml alebo 1 ml PBS bez formaldehydu, ak sa preparáty budú analyzovať do 2 hodín.

Poznámka: Preparáty vždy uchovávajte pri teplote 2 až 8 °C a mimo dosahu svetla.

OČAKÁVANÉ HODNOTY

Každé laboratórium musí zhromaždiť vlastné referenčné hodnoty založené na skupine zdravých darcov vybraných z miestnej populácie. Do úvahy je treba brať vek, pohlavie a etnickú príslušnosť darcov, rovnako ako ďalšie potenciálne regionálne rozdiely.

V našich laboratóriách bola plná krv získaná od 50 zdravých dospelých darcov inkubovaná s vyššie uvedenou reagentiou. Získané výsledky, ktoré vyjadrujú zastúpenie častíc pozitívne označených touto reagentiou sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

Lymfocyty	Počet	Priemer (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocyty	Počet	Priemer (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

VÝKONNOSŤ

Údaje na stanovenie charakteristiky sa získavajú na základe vyššie uvedeného postupu z24 hodín starej krvnej vzorky odobranej do sterilných skúmaviek, obsahujúcich soľ EDTA ako antikoagulačné činidlo. Analýza sa vykonáva počas 2 hodín po imunologickom farbení.

ŠPECIFICITA

Monoklonálna protilátka (mAb) 13B8.2 rozpoznáva na molekule CD4 epitop V1 domény imunoglobulinového typu ("Ig-like"). Pri mapovaní epitopov pri použití cielených mutácií v extracelulárnej časti molekuly bolo zistené, že k porušeniu väzby monoklonálnej protilátky 13B8.2 prišlo iba v prípade, kedy bol mutáciou ovplyvnený 88. a/alebo 89. aminokyselinový zbytok (4). Monoklonálna protilátka 13B8.2 inhibuje in vitro väzbu HIV-1. Špecificita rozpoznania CD4 monoklonálnou protilátkou 13B8.2 bola uznaná v rámci 3. konferencie o ľudských leukocytárných diferenciačných antigénoch ("3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens"), ktorá sa konala v roku 1986 v Oxforde v Anglicku (WS kód: 501, sekcia: T) (5).

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV V RÁMCI LABORATÓRIA

Bolo vykonaných 12 stanovení percentuálneho zastúpenia pozitívnych buniek na jednej vzorke. Meranie prebehlo v jeden deň na rovnakom prietokovom cytometri. Získané výsledky zhŕňa nasledujúca tabuľka:

Pozitívny cieľ	Počet	Priemer (%)	SD	CV (%)
Lymfocyty CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearita

Na testovanie linearity stanovenia pri použití tejto reagentie boli v rôznych pomeroch zmiešané bunky pozitívnej bunkovej línie ((HPBALL)) a bunky negatívnej bunkovej línie ((DAUDI)) tak, aby konečný počet buniek v zmesi bol konštantný a aby sa pomer buniek pozitívnej línie / negatívnej línie pohyboval v rozmedzí od 0 - 100 %.

Alikvóty boli spracované vyššie popísaným spôsobom a bola vykonaná lineárna regresia pre očakávané a získané hodnoty.

Špecificita	Lineárna regresia	Linearita (R ²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

OBMEDZENIA

1. Prietoková cytometria môže vytvárať falošné výsledky, ak cytometer nie je správne zarovnaný, ak úniky fluorescence nie sú správne kompenzované, alebo ak nie sú oblasti správne umiestnené.
2. Reagentia dosiaľ nebola optimalizovaná pre použitie v lyzačnej technike bez premývania, preto je vhodnejšie použiť metódu lýzy s následným premývaním vzorky.
3. Presné a reprodukovateľné výsledky sa získajú len vtedy, ak sa použijú postupy v súlade s technickými údajmi v príbalovom letáku a v súlade s osvedčenou laboratórnou praxou.
4. Konjugovaná protilátka tohto činidla sa kalibruje tak, aby ponúkala najlepší pomer špecifického signálu/nešpecifického signálu. Preto je dôležité pri každom teste dodržať pomer objem činidla/objem vzorky.
5. V prípade hyperleukocytózy zriedte krv v PBS na koncentráciu približne 5×10^9 leukocytov/l (6).
6. Pri niektorých chorobných stavoch, akými sú napríklad závažné zlyhanie obličiek alebo hemoglobínopatie, môže byť lýza červených krviniek pomalá, neúplná alebo dokonca nemožná. V takom prípade sa odporúča pred farbením izolovať mononukleárne bunky pomocou hustotného gradientu (napríklad Ficoll) (7).

Príklady a referencie nájdete v Dodatku.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Beckman Coulter, štylizované logo a známky produktov a služieb spoločnosti Beckman Coulter spomenuté v tomto dokumente sú ochranné známky alebo registrované ochranné známky spoločnosti Beckman Coulter, Inc. v USA a ďalších krajinách.

Popis symbolov

Slovník symbolov je dostupný na adrese beckman.com/techdocs (číslo dokumentu B60062)

	규격
특이도	CD4
클론	13B8.2
하이브리도마	NS1 x balb/c
면역원	Human thymocytes
면역글로불린	IgG1
종	생쥐
정제	친화성 크로마토그래피
형광 색소	R Phycoerythrin (PE)
분자비	PE/Ig: 0.5 - 1.5
λ 자극	488 nm
방출 피크	575 nm
완충액	PBS pH 7.2 + 2mg/mL BSA 및 0.1 % NaN ₃

IOTest 복합 항체 CD4-PE

[REF] A07751 100 tests; 2 mL, 20 μ L/검사

체의 진단용

사용목적

이 형광 색소 결합 항체를 이용한 유동 세포 분석법으로 사람의 생물학적 검체에 있는 CD4 항원을 나타내는 세포군을 동정하고 계수할 수 있습니다.

원리

이 검사는 백혈구로 발현되는 항원 결정기에 특이적 단일클론 항체가 결합할 수 있는 능력에 기초합니다.

백혈구의 특이적 염색은 검체를 IOTest 시약과 함께 배양하여 수행합니다. 그런 다음 적혈구를 용해하여 제거하고 이 과정에서 영향을 받지 않은 백혈구를 유세포 분석법을 통해 분석하십시오.

유세포 분석기는 세포의 빛 확산과 형광 영역을 측정합니다. 유세포 분석기를 사용하면 빛의 직교 확산(측면 산란, SS)과 좁은 각의 광확산(전방 산란, FS)의 상호 관계를 지정하는 막대그래프상에 정의된 전자 창 내에서 관심 개체의 한계를 결정할 수 있습니다. 유세포 분석기에서 사용할 수 있는 두 가지 파라메타를 결합하는 기타 막대그래프를 사용자가 선택한 애플리케이션에 따라 게이팅 단계에서 지원 자료로 사용 가능합니다.

범위가 결정된 세포의 형광 영역을 분석하여 명확하게 염색된 이벤트와 염색되지 않은 이벤트를 구분합니다. 분석 결과는 게이팅으로 획득한 전체 이벤트와 비교한 양성 이벤트의 비율로 표현합니다.

임상 적용 사례

이 시약은 AIDS(1)와 기타 면역결핍, 자가면역 장애(2), 과민 반응, 바이러스 감염, 골수 및/또는 장기 이식 후 면역 반응 회복 등의 면역 체계 장애에서 CD4+ 림프구 세포 모집단의 특성화를 가능하게 합니다. 백혈병, 림프종 등 악성 혈액 질환의 CD4+ 세포 모집단(3)의 후속조치 및 표현형 분석.

시약

농도: 로트별 분석 증명서 (www.beckmancoulter.com)를 참조하십시오.

경고 및 주의 사항

1. 유효 기간이 지난 시약은 사용하지 마십시오.
2. 냉동하지 마십시오.
3. 사용 전 실온(18~25°C)에 두십시오.
4. 빛 노출을 최소화하십시오.
5. 시약이 미생물에 오염되지 않도록 하십시오. 그러지 않으면 잘못된 결과를 얻을 수 있습니다.
6. 아지드화나트륨(NaN₃)을 함유한 항체 용액은 주의해서 다루어야 합니다. 흡입을 피하고 피부, 점막 및 눈에 절대 닿지 않도록 하십시오.
또한 산성 매질에 함유된 아지드화나트륨은 잠재적 위험 물질인 히드라조산을 만들어낼 수 있습니다. 시약을 폐기할 때는 금속 파이프 내 아지드화나트륨 축적과 폭발 위험을 방지하기 위해 다량의 물에 희석한 후 배수 시설로 흘려보내야 합니다.
7. 모든 혈액 검체는 잠재적으로 전염성이 있다고 간주하고 주의해서 다루어야 합니다(특히 보호용 장갑, 가운 및 보안경 착용).
8. 절대로 입으로 채취하거나 피부, 점막, 눈에 표본이 닿아서는 안 됩니다.
9. 취급에 사용한 혈액 튜브 및 일회용 물질은 소각용 특수 용기에서 폐기해야 합니다.
10. 시약 및 폐기물은 현지 요구 사항에 따라 제거해야 합니다.

GHS 유해물질 등급

유해물질로 분류되지 않음



안전보건자료는 techdocs.beckman.com에서 확인할 수 있습니다

보관 및 안정성

결합액은 용기를 연 후 직사광선을 피해 2 – 8°C 온도에서 보관해야 합니다.

미개봉 바이알의 안정성: 바이알에 표시된 만료일을 참조하십시오.

개봉한 바이알의 안정성: 시약은 180일 동안 안정적입니다.

검체

정맥혈은 EDTA 염을 항응고제로 포함한 무균 튜브를 사용하여 채취해야 합니다.

검체는 실온(18~25°C)에 보관해야 하며 흔들어서는 안 됩니다. 검사 검체를 채취하기 전에 부드럽게 교반하여 검체를 균질화해야 합니다.

검체는 정맥천자 후 24시간 이내에 분석해야 합니다.

성능 저하 증거

시약 외관에 물리적 변화가 있는 경우 성능 저하를 나타내는 것일 수 있으므로 시약을 사용해서는 안 됩니다.

포장이 변형되거나 획득 데이터가 일부 성능 변화를 보여주는 경우에는 현지 판매업체에 문의 하거나 다음 이메일 주소를 이용하십시오.
immuno-techsup@beckmancoulter.com

목차

소듐 아자이드 보존제는 금속 배수관에서 폭발성 화합물을 형성할 수 있습니다. NIOSH 게시판을 참조하십시오. Explosive Azide Hazard(폭발성 아지드 유해물질)(76/8/16)
아지드 화합물의 축적 가능성을 방지하려면 희석되지 않은 시약을 폐기한 다음 폐기 파이프를 물로 세척하십시오. 소듐 아자이드의 폐기는 해당 지역 규정을 따라야 합니다.

필요하지만 키트와 함께 제공되지 않는 품목:

- 검체 튜브와 검체 채취에 필요한 물질.
- 20, 100 및 500µL용 일회용 팁이 있는 자동 피펫.
- 플라스틱 용혈 튜브.
- 용해 후 세척 단계의 적혈구 용해 시약. 예: VersaLyse(참조 A09777).
- 백혈구 고정 시약. 예: IOTest 3 고정액(참조 A07800).
- 동형 대조물질 PE: IOTest 시약(참조 A07796).
- 완충액(PBS: 0.01M 인산나트륨, 0.145M 염화나트륨, pH 7.2).
- 원심분리기.
- 자동 교반기(교반 유형).
- 유세포 분석기.

VERSALYSE 시약을 이용한 절차

참고: 아래 절차는 표준 응용분야에 적합합니다. 특정 Beckman Coulter 응용분야의 검체 및/또는 VersaLyse 용적이 다를 수 있습니다. 그러한 경우에는 해당 응용분야의 기술 책자에 나와 있는 지침을 따르십시오.

분석할 각 검체마다 테스트 튜브 외에 동형 대조물질이 있는 상태에서 세포를 혼합하는 하나의 컨트롤 튜브가 필요합니다(참조 A07796).

- 각 테스트 튜브에 20 µL의 특정 IOTest 결합 항체를 추가하고 각 제어 튜브에 20 µL의 아이소타입 통제를 추가합니다.
- 100 µL의 테스트 검체를 두 튜브에 첨가합니다. 튜브를 부드럽게 교반합니다.
- 실온(18~25°C)에서 빛을 피해 15~20분 동안 배양하십시오.
- 그런 다음 사용할 용해 시약 권고 사항에 따라 필요한 경우 적혈구 용해를 수행합니다. 예를 들어 VersaLyse(REF A09777)를 사용하려는 경우 책자 내용을 참조하여 즉석에서 준비된 1 mL의 "고정 및 세포 용해" 혼합물을 첨가하는 "수반 고정" 절차를 따릅니다. 즉시 1초 동안 교반한 후 직사광선을 피해 상온에서 10분 동안 배양합니다. 검체에 적혈구가 없는 경우, 2 mL의 PBS를 추가합니다.
- 상온에서 150 x g로 5분 동안 원심분리합니다.
- 흡입 시 상청액을 제거하십시오.
- 3mL의 PBS를 사용하여 세포 펠릿을 재현탁합니다.
- 5단계를 반복합니다.
- 그런 다음 흡입 방식으로 상등액을 제거하고 다음을 사용하여 세포 펠릿을 재현탁합니다.

조제 물질을 24시간 이내로 보관하려는 경우 0.1 %의 포르말데히드가 함유된 0.5 mL 또는 1 mL의 PBS. (0.1 % 포르말데히드 PBS는 12.5 µL의 IOTest 3 고정액(REF A07800)을 10배 농도로 1 mL의 PBS에 희석하여 얻을 수 있음).

조제 물질을 2시간 이내에 분석하려는 경우 포르말데히드가 없는 0.5mL 또는 1mL의 PBS.

참고: 조제물은 항상 빛을 피해 2~8°C로 유지하십시오.

예상 수치

각 실험실에서는 현지 개체군의 건강한 공여자 그룹을 바탕으로 한 참조 값 목록을 작성해야 합니다. 이 작업은 기타 잠재적인 지역별 차이뿐만 아니라 나이, 성별 및 인종 그룹을 고려하여 수행해야 합니다.

실험실에서 50명의 건강한 성인의 전혈 검체를 위에 설명된 시약을 사용하여 처리했습니다. 이 시약에서 관심 대상의 양성 건수 계산을 위해 얻은 결과는 아래 표와 같습니다.

림프구	번호	평균(%)	표준편차	CV(%)
CD4-PE+	50	55.91	10.82	19.4

단핵 백혈구	번호	평균(%)	표준편차	CV(%)
CD4-PE+	50	90.86	4.97	5.47

성능

성능 데이터는 위에 설명한 절차를 이용하여 이전에 EDTA 염을 항응고제로 하여 무균 튜브에서 수집한 24시간된 혈액 검체로 획득합니다. 분석은 면역 염색 후 2시간 이내에 수행됩니다.

특이도

단일 클론 항체(mAb) 13B8.2는 CD4 항원의 면역글로불린 유사 V1 영역에 있는 항원결정인자를 인식합니다. 분자의 세포질 외 영역을 표적으로 하는 돌연변이를 사용하는 항원결정인자 지도 연구에 따르면 돌연변이가 88 및/또는 89 잔류물과 관련된 경우에 한해 mAb 13B8.2 고정기 영향을 받는 것으로 나타났습니다(4). MAb 13B8.2는 HIV-1의 체외 고정을 억제합니다. MAb13B8.2는 1986년 영국 옥스포드에서 열린 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens(인간 백혈구 감별 항원에 관한 제 3차 HLDA 워크숍)(WS 코드: 501, 섹션: T)에서 CD4에 할당되었습니다(5).

실험실간 재현성

같은 날 같은 세포측정기를 사용하여 양성 표적의 염색 비율에 대한 측정을 12회 실시했습니다. 얻은 결과는 아래 표에 요약되어 있습니다:

양성 표적	번호	평균(%)	표준편차	CV(%)
림프구 +CD4-PE	12	37.84	0.80	2.1

선형성

이 시약의 염색 선형성을 테스트하기 위해 양성 세포 라인(HPBALL)과 음성 세포 라인((DAUDI))을 최종 세포 수는 일정하게 하되 다양한 비율로 섞어 혼합물의 양성 세포 라인/음성 세포 라인 비율이 0~100 %가 되도록 했습니다.

위에 설명된 절차에 따라 소분 검체를 염색하고 예상 값과 관찰 값 사이의 선형회귀를 계산했습니다.

특이도	선형회귀법	선형성(R²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0.38$	0.9998

한계

- 1. 유세포 분석기가 완벽하게 정렬되지 않은 경우, 형광 누출이 올바르게 보정되지 않은 경우 또는 영역 위치를 신중하게 지정하지 않은 경우 유세포 분석법에서 잘못된 결과가 나올 수 있습니다.
- 2. 이 시약은 "무세척" 세포 용해 기법에 최적화 되지 않았으므로 세척 단계가 있는 RBC 세포 용해 기법을 사용하는 것이 좋습니다.
- 3. 사용한 절차가 동봉된 기술 책자의 내용을 따르고 실험실 모범 사례와 호환되는 경우 정확하고 재현 가능한 결과를 얻을 수 있습니다.
- 4. 이 시약의 결합 항체는 최상의 특이/비특이 신호비를 제공하도록 보정됩니다. 그러므로 모든 검사에서 시약의 용적/검체 용적 비율을 준수하는 것이 중요합니다.
- 5. 과백혈구 증가증의 경우 혈액을 PBS에 희석하여 대략 백혈구 5×10^9 개/L 값을 얻어야 합니다(6).
- 6. 심한 신부전 또는 혈액소병증 같은 특정 질병 상태에서 적혈구의 용해는 느리거나 불안정하거나 심지어는 불가능할 수도 있습니다. 이러한 경우 염색 전에 밀도 구배(예: Ficoll)를 사용하여 단핵구 세포를 분리하는 것이 좋습니다(7).

예시와 참고 자료는 부록을 참조하십시오.

상표

본 문서에 포함된 Beckman Coulter, 스타일 로고, Beckman Coulter 제품 및 서비스 마크는 미국 및 기타 국가에서 Beckman Coulter, Inc.의 상표이거나 등록 상표입니다.

기호 목록

기호 용어집은 beckman.com/techdocs에서 확인할 수 있습니다(문서 번호 B60062)

	Spesifikasyonlar
Özgüllük	CD4
Klon	13B8.2
Hibridoma	NS1 x balb/c
İmmünojen	Human thymocytes
İmmunoglobulin	IgG1
Türler	Fare
Aritma	Afinite Kromatografisi
Florokrom	R Phycoerythrin (PE)
Molar oran	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ eksitasyonu	488 nm
Emisyon piki	575 nm
Tampon	PBS pH 7,2 artı 2 mg/mL BSA ve %0,1 NaN ₃

IOtest Konjuge Antikor CD4-PE

[REF] A07751 100 tests; 2 mL, 20 µL/test

In Vitro Diagnostik Kullanım içindir

KULLANIM AMACI

Bu florokrom-konjuge antikor biyolojik insan numuneleri içinde bulunan CD4 antijenini eksprese eden hücre popülasyonlarının akım sitometrisi ile tanımlanması ve sayılmasını sağlar.

İLKE

Bu test, spesifik monoklonal antikorların lökositler tarafından eksprese edilen antijenik belirleyicilere bağlanabilmesine dayanmaktadır.

Lökositlerin spesifik boyaması, örnek, IOtest reaktifi ile inkübe edilerek gerçekleştirilir. Sonra kırmızı hücreler parçalanarak giderilir ve bu işlemde etkilenmeyen lökositler, akış sitometrisi ile analiz edilir.

Akış sitometrisi ışık difüzyonunu ve hücre floresanını ölçer. Bu durum, ilgili popülasyonun, ışığın ortogonal difüzyonu (Yana Yayılma veya SS) ve dar açılı ışığın difüzyonu (İleri Yayılma veya FS) ile ilişkilendirilen histogram üzerinde tanımlanmış elektronik pencerede sınırlanmasını sağlar. Sitometredeki farklı parametrelerden ikisini birleştiren diğer histogramlar, kullanıcının seçtiği uygulamaya bağlı olarak kapılama aşamasında destek olarak kullanılabilir.

Sınırlı hücrelerin floresanı analiz edilerek pozitif boyalı olaylar boyasızlardan ayrılır. Sonuçlar pozitif olayların geçiş ile edinilmiş tüm olaylara yüzdesi olarak ifade edilir.

KLİNİK UYGULAMA ÖRNEKLERİ

Bu reaktif, immün sistemi bozukluklarında CD4+ lenfositik hücre popülasyonlarının karakterizasyonuna izin verir: AIDS (1) ve diğer immün yetmezlikleri, otoimmün bozuklukları (2), hipersensitivite reaksiyonları, viral enfeksiyonlar, kemik iliği ve/veya organ nakli sonrasında immün yanıt restorasyonu. Lösemi ve lenfoma gibi malign kan diskrazisinde CD4+ hücre popülasyonlarının (3) takibi ve fenotiplemesi.

REAKTİFLER

Konsantrasyon: www.beckmancoulter.com adresinde lota spesifik Analiz Sertifikasına bakın.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. Reaktifi son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
2. Dondurmayın.
3. Kullanmadan önce oda sıcaklığına (18-25°C) getirin.
4. Işığa maruz kalmasını en aza indirin.
5. Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonundan kaçının yoksa yanlış sonuçlar oluşabilir.
6. Sodyum azid (NaN₃) içeren antikor solüsyonları dikkatle işlenmelidir. Yutmayın ve cilt, mukoza ve gözlerle temasından kaçının.
Ayrıca, asit ortamında, sodyum azid potansiyel olarak tehlikeli hidrazoik asit oluşturabilir. Atılması gerekiyorsa, metal borularda sodyum azid birikmesini ve patlama riskini önlemek için, reaktifin drenaj sistemine dökülmeden önce çok miktarda suyla seyreltilmesi önerilmektedir.
7. Tüm kan örnekleri potansiyel olarak bulaşıcı olarak kabul edilmeli ve dikkatle ele alınmalıdır (özellikle koruyucu eldiven, önlük ve gözlük takılmalıdır).
8. Asla ağızla pipetleme yapmayın ve numunelerin cilt, mukoza ve gözlerle herhangi şekilde temasından kaçının.
9. Taşıma için kullanılan kan tüpleri ve tek kullanımlık malzeme, yakma amacıyla özel kaplara atılmalıdır.
10. Reaktifler ve atıklar yerel gereksinimlere göre elimine edilmelidir.

GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

Tehlikeli olarak sınıflandırılmamıştır

[SDS]

Güvenlik Veri Sayfası beckman.com/techdocs adresinde bulunabilir

SAKLAMA VE STABİLİTE

Konjuge sıvı formlar flakon açılmadan önce ve açıldıktan sonra 2 ila 8°C arasında saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır.

Kapalı şişenin stabilitesi: şişenin üzerindeki son kullanma tarihine bakın.

Açılan şişenin stabilitesi: reaktif 180 gün stabildir.

ÖRNEKLER

Antikoagülan olarak EDTA tuzu içeren steril tüpler kullanılarak venöz kan alınmalıdır.

Örnekler oda sıcaklığında (18-25°C) tutulmalı ve çalkalanmamalıdır. Örnekler test örneği alınmadan önce hafifçe çalkalanarak homojenize edilmelidir.

Örnekler venipunktür sonrası 24 saat içinde analiz edilmelidir.

BOZULMA GÖSTERGESİ

Reaktiflerin fiziksel görünümündeki herhangi bir değişiklik bozulmayı gösterebilir ve reaktif kullanılmamalıdır.

Paketleme bozulması durumunda veya elde edilen veriler performansta biraz değişiklik gösteriyorsa lütfen yerel distribütörünüzle irtibat kurun veya şu e-posta adresini kullanın:

İÇİNDEKİLER

Sodyum azid koruyucu maddesi metal kanalizasyon hatlarında patlayıcı bileşimler oluşturabilir. NIOSH Bültenine bakın: Explosive Azide Hazard (Patlayıcı Azide Tehlikesi) (16.8.76).

Azid bileşenlerinin olası birikimini engellemek amacıyla, seyreltilmemiş reaktif çöpe atıldıktan sonra atık borularını bol suyla yıkayın. Sodyum azid, uygun yerel düzenlemelere göre çöpe atılmalıdır.

GEREKLİ OLAN ANCAK KİT İLE BİRLİKTE VERİLMEYEN MALZEMELER:

- Numune alma tüpleri ve numune alma için gerekli malzemeler.
- 20, 100 ve 500 µL için tek kullanımlık uçlu otomatik pipetler.
- Plastik hemoliz tüpleri.
- Lizis sonrası yıkama aşamasıyla birlikte eritrosit lizis reaktifi. Örneğin: VersaLyse (Ref. A09777).
- Lökosit fiksasyon reaktifi. Örneğin: IOTest 3 Fiksasyon Solüsyonu (Ref. A07800).
- İzotipik kontrol PE : IOTest reaktifi (Ref. A07796.).
- Tampon (PBS: 0,01 M sodyum fosfat; 0,145 M sodyum klorür; pH 7,2).
- Santrifüjleyin.
- Otomatik karıştırıcı (Vorteks tipi).
- Akış sitometresi.

VERSALYSE REAKTİFİ İLE PROSEDÜR

Not: Aşağıdaki prosedür standart uygulamalar için geçerlidir. Belirli Beckman Coulter uygulamaları için numune ve/veya VersaLyse hacimleri farklı olabilir. Böyle bir durum söz konusu ise, uygulama teknik broşüründeki talimatları izleyin.

Analiz edilen her numune için, test tüpüne ek olarak içinde hücrelerin izotipik kontrol (Ref. A07796.) ile karıştırılacağı bir kontrol tüpü gereklidir.

- Her test tüpüne 20 µL spesifik IOTest konjüge antikor ekleyin ve her kontrol tüpüne 20 µL izotipik kontrol ekleyin.
- Her iki tüpe 100 µL test numunesi ekleyin. Tüpleri yavaşça vorteksleyin.
- Oda sıcaklığında (18-25°C) ışıktan koruyarak 15-20 dakika boyunca inkübe edin.
- Daha sonra kırmızı hücrelerin parçalanma işlemini, gerekirse kullanılan parçalama reaktifi ile ilgili tavsiyeleri izleyerek gerçekleştirin. Örnek olarak, VersaLyse (Ref. A09777) kullanmak istiyorsanız, broşüre bakın ve tercihen kullanıma hazır "Fix-and-Lyse" karışımından 1 mL eklenmesini içeren "konkomitant sabitleme ile" olarak adlandırılan prosedürü takip edin. Hemen bir saniye kadar vorteksleyin ve oda sıcaklığında ışıktan koruyarak 10 dakika boyunca inkübe edin. Numune kırmızı hücreler içermiyorsa, 2 mL PBS ekleyin.
- Oda sıcaklığında 5 dakika 150 x g hızda santrifüjleyin.
- Aspirasyon ile üst fazı alın.
- 3 mL PBS kullanarak hücre peletini yeniden süspanse edin.
- Adım 5'i tekrarlayın.
- Yüzer maddeyi aspirasyonla alın ve hücre topağını şunu kullanarak yeniden süspanse edin:
Preparatlar 24 saatten az tutulacaksa, 0,5 mL veya 1 mL PBS'nin yanı sıra %0,1 formaldehid. (%0,1 formaldehid PBS, 1 mL PBS içinde 10X konsantre IOTest 3 Fiksasyon Solüsyonundan (REF A07800) 12,5 µL seyreltilerek elde edilebilir).
- 0,5 mL veya 1 mL PBS formaldehidsiz, preparatlar 2 saat içinde analiz edilmelidir.

Not: Tüm durumlarda, preparatlar 2 ile 8°C arasında tutulmalı ve ışıktan korunmalıdır.

BEKLENEN DEĞERLER

Her laboratuvar yerel popülasyondaki bir grup sağlıklı donöre dayanarak bir referans değerler listesi derlemelidir. Bu derleme yaş, cinsiyet ve etnik grup ile birlikte herhangi diğer potansiyel bölgesel farklılıklar dikkate alınarak yapılmalıdır.

Bizim laboratuvarlarımızda, 50 sağlıklı yetişkinden alınan tam kan numuneleri yukarıda açıklanan reaktif kullanılarak işleme tabi tutulmuştur. Bu reaktif ile söz konusu pozitif olayların sayımı için elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablolarda verilmektedir :

Lenfositler	Sayı	Ortalama (%)	SS	VK (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monositler	Sayı	Ortalama (%)	SS	VK (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

PERFORMANS

Performans verileri, antikoagulan olarak EDTA tuzu içeren steril tüplerde daha önce toplanan 24-saatlik kan numuneleri hakkında yukarıda tanımlanan prosedür kullanılarak elde edilir. Analizler immün boyamayı izleyen 2 saat içinde gerçekleştirilir.

ÖZGÜLLÜK

Monoklonal antikor (mAb) 13B8.2 CD4 antijeninin Ig-benzeri V1 bölgesinde bulunan bir epitopu tanıır. Molekülün sitoplazma dışı bölgelerini hedefleyen mutasyonlar kullanan epitopik harita ile ilgili bir çalışma mAb 13B8.2'nin sabitlenmesinin sadece mutasyon 88 ve/veya 89 kısımları ile ilgili olduğunda etkilendiğini göstermiştir (4). MAb 13B8.2 HIV-1'in in vitro sabitlenmesini inhibe eder. MAb13B8.2 beständes till CD4 under den 3:e HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, Oxford, England 1986 (WS Code : 501, Section : T) (5).

LABORATUVAR İÇİ TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİK

Pozitif bir hedefin boyanma yüzdesi ile ilgili 12 ölçüm aynı günde ve aynı sitometre kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlenmektedir:

Pozitif Hedef	Sayı	Ortalama (%)	SS	VK (%)
Lenfositler CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Linearite

Bu reaktifin boyama özelliğinde doğrusallığın test edilmesi için bir pozitif hücre hattı ((HPBALL)) ve bir negatif hücre hattı ((DAUDI)) nihai hücre sayısı sabit kalacak şekilde farklı oranlarda karıştırılmıştır, böylelikle karışımın pozitif hat/negatif hat oranı %0 ila 100 arasında bulunmuştur.

Numuneden alınan küçük kısımlar yukarıda tarif edilen prosedürle boyanmış ve beklenen değerler ile gözlenen değerler arasındaki lineer regresyon hesaplanmıştır.

Özgüllük	Lineer regresyon	Doğrusallık (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

SINIRLAMALAR

- Akış sitometrisi, sitometre mükemmel şekilde hizalanmadıysa, floresan sızıntıları doğru şekilde telafi edilmediyse ve bölgeler dikkatli bir şekilde konumlandırılmadıysa yanlış sonuçlar üretebilir.
- Bu reaktif "yıkamasız" parçalama tekniği için optimize edilmediğinden, yıkama adımlı bir RBC parçalama tekniğinin kullanılması tercih edilir.
- Kullanılan prosedürler teknik bilgi broşürüne uygun olduğu ve iyi laboratuvar uygulamalarına uygun olduğu sürece doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecektir.
- Bu reaktifin konjugat antikor, en iyi spesifik sinyal/spesifik olmayan sinyal oranını sunacak şekilde kalibre edilir. Bu nedenle her testte reaktif hacmi/örnek hacmi oranına bağlı kalmak önemlidir.
- Hiperlökositöz durumunda yaklaşık 5×10^9 lökosit/L (6) değerini elde etmek için kanı PBS içinde seyreltin.
- Şiddetli böbrek yetmezliği veya hemoglobinopatiler gibi bazı hastalık durumlarında, eritrosit lizisi yavaş, eksik ve hatta imkansız olabilir. Bu durumda mononükleotidli hücrelerin boyama öncesinde yoğunluk gradyanı (örneğin Ficoll) kullanılarak izole edilmesi önerilmektedir (7).

Örnekler ve referanslar için Ek'e bakın.

TİCARİ MARKALAR

Bu belgede belirtilen Beckman Coulter, stilize logo ve Beckman Coulter ürün ve hizmet markaları, Beckman Coulter, Inc. firmasının ABD'de ve diğer ülkelerdeki ticari veya tescilli ticari markalarıdır.

Sembol Anahtarı

Semboller Sözlüğü beckman.com/techdocs adresinde bulunabilir (belge numarası B60062)

	Спецификации
Специфичность	CD4
Клон	13B8.2
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
Молярное отношение	PE / Ig: 0,5 - 1,5
Возбуждение λ	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	PBS pH 7,2 плюс 2 мг/мл БСА и 0,1% NaN ₃

Конъюгированное антитело IOTest CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 мл, 20 мкл/тест

Применяется для *In Vitro* диагностики.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD4, и подсчитывать их количество в биологических образцах человека с помощью проточной цитометрии.

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связывать антигенные детерминанты, экспрессированные лейкоцитами.

Специфическое окрашивание лейкоцитов выполняется путем инкубирования пробы с реагентом IOTest. Затем методом лизиса удаляются эритроциты, и выполняется анализ лейкоцитов, не затронутых этим процессом, методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр измеряет светорассеяние и флуоресценцию клеток. Это дает возможность разграничения интересующей популяции в электронном окне, определенном на гистограмме, что коррелирует с ортогональным светорассеянием (боковое рассеяние, или SS) и рассеянием света под острым углом (прямое рассеяние, или FS). Другие гистограммы, сочетающие два из других параметров, доступных на цитометре, могут использоваться как вспомогательные на стадии селекции, в зависимости от приложения, выбранного пользователем.

Флуоресценцию разграниченных клеток анализируют с целью различения положительно-окрашенных и неокрашенных событий. Результаты выражаются в виде процентного отношения положительных событий ко всем событиям, полученным в ходе селекции.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Этот реагент обеспечивает описание клеточных популяций лимфоцитов CD4+ при заболеваниях иммунной системы: СПИД (1) и другие состояния иммунодефицита, аутоиммунные заболевания (2), реакции гиперчувствительности, вирусные инфекции, восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа. Последующее наблюдение и фенотипирование клеточных популяций CD4+ (3) при злокачественных дисक्रазиях крови, таких как лейкомии и лимфомы.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реагенты после истечения срока годности.
2. Не замораживать.
3. Перед использованием довести до комнатной температуры (18–25°C).
4. Минимизируют воздействие света.
5. Во избежание получения ошибочных результатов не допускайте микробной контаминации реагентов.
6. Следует с осторожностью обращаться с растворами антител, содержащими натрия азид (NaN₃). Не принимайте внутрь и избегайте любого контакта с кожей, слизистыми оболочками и глазами.

Кроме того, в кислой среде натрия азид может образовывать потенциально опасную азотистоводородную кислоту. Если требуется утилизация, рекомендуется разводить реагент в большом объеме воды, прежде чем выливать его в канализацию, чтобы избежать накопления натрия азидата в металлических трубах и исключить возможность взрыва.

7. Все пробы крови должны считаться потенциально инфицированными, при обращении с ними необходимо соблюдать осторожность (в частности, использовать защитные перчатки, одежду и очки).
8. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки и глаза.
9. При утилизации пробирок и одноразовых материалов следует использовать специальные предназначенные для сжигания контейнеры.
10. При утилизации реагентов и отходов необходимо следовать требованиям местного законодательства.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество



Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Жидкие конъюгаты до и после вскрытия флакона следует хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

Стабильность закупоренного флакона: см. срок годности флакона.

Стабильность в открытом флаконе: реагент сохраняет стабильность в течение 180 дн.

ПРОБЫ

При взятии образца венозной крови необходимо использовать стерильные пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Пробы следует хранить при комнатной температуре (18–25°C), не встряхивая. Пробы следует гомогенизировать, осторожно перемешав, до отбора тестовой пробы.

Пробы требуется проанализировать в течение 24 ч после венипункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любые изменения внешнего вида реагентов могут говорить о порче, использовать такой реагент не следует.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азидов натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH): Explosive Azide Hazard (Взрывоопасные азиды) (16.8.76). Чтобы избежать накопления азидных соединений, промывайте сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азидов натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР:

- Необходимые для взятия проб пробирки и материалы.
- Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками для 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реагент для лизиса эритроцитов с этапом промывки после лизиса. Например: VersaLyse (ссылочный номер A09777).
- Реагент для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (фиксирующий раствор) (ссылочный номер A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (PBS: 0,01 М натрия фосфата; 0,145 М натрия хлорида; pH 7,2).
- Центрифугируйте.
- Автоматическая мешалка (вортексная)
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА С РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

Примечание: Описанная ниже процедура действительна для стандартных приложений. Для ряда приложений Beckman Coulter объемы образца и реактива VersaLyse могут различаться. В таких случаях необходимо следовать инструкциям, приведенным в описании приложения.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.
3. Инкубируют при комнатной температуре (18–25°C) в течение 15-20 мин, в защищенном от света месте.
4. Затем производят лизис эритроцитов, при необходимости пользуясь рекомендациями по использованию реактива для лизиса. Например, если используется VersaLyse (Ref. A09777), следует обратиться к листку-вкладышу и рекомендуется воспользоваться процедурой «с одновременной фиксации», которая состоит в добавлении 1 мл смеси “Fix-and-Lyse” приготовляемой ex tempore. Немедленно встряхивают на Vortex в течение одной секунды, а затем инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Если образец не содержит эритроцитов, добавляют 2 мл ФСБ.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют надосадочную жидкость путем аспирации.
7. Ресуспенсируют осадок клеток, используя 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют надосадочную жидкость путем аспирации и ресуспенсируют осадок клеток, используя:
0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10х в 1 мл PBS).
0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если препараты следует проанализировать в течение 2 ч.

Примечание. В обязательном порядке защищайте подготавливаемые материалы от солнечного света, храните их при температуре от 2 до 8°C.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна определить собственные референсные интервалы на основании исследования образцов здоровых доноров местной популяции. При этом необходимо учитывать возраст, пол и этническую принадлежность доноров, а также другие возможные межрегиональные различия.

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Число	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Моноциты	Число	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Данные о работе системы получены с применением описанной выше процедуры на образцах крови, собранных за 24 часа до исследования в стерильные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. Анализ выполнен не позднее чем через 2 часа после иммунного окрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело (мАт) 13B8.2 распознает эпитоп, который находится в составе Ig-подобной области V1 антигена CD4. Исследование карты эпитопов с помощью мутаций во внецитоплазматических областях молекулы показало, что фиксация мАт 13B8.2 нарушается только в тех случаях, когда мутации включают остатки 88 и/или 89 (4). Мат 13B8.2 подавляет фиксацию ВИЧ-1 in vitro. Специфичность мАт 13B8.2 в отношении CD4 была установлена III Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Оксфорде, Великобритания, в 1986 г. (код WS: 501, раздел: T) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений процентного содержания окрашенных клеток в целевой популяции. Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Положительная мишень	Число	Среднее (%)	SD	CV (%)
Лимфоциты CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) смешали в различных пропорциях так, чтобы все полученные смеси содержали одно и то же конечное число клеток, а отношение числа положительных клеток к числу отрицательных клеток находилось в диапазоне от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии описанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При проведении проточной цитометрии возможно получение ложных результатов, если цитометр не был идеально позиционирован, не была проведена правильная компенсация утечек флуоресцентного агента или точное позиционирование областей.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.
3. Для получения точных и повторяемых результатов необходимо выполнять процедуры в соответствии с инструкцией-вкладышем и требованиями надлежащей лабораторной практики.
4. Выполняется калибровка конъюгированного антитела этого реагента с целью получения наилучшего для данной конкретной задачи соотношения специфичного и неспецифичного сигнала. Поэтому при каждом тесте важно придерживаться правильного соотношения объема реагента и пробы.
5. При гиперлейкоцитозе, разбавляют кровь PBS до приблизительно 5×10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях, таких как острая почечная недостаточность или гемоглобинопатии, лизис эритроцитов может протекать медленно, быть неполным или даже невозможным. В таком случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки, используя градиент плотности (например, фиколл), перед окрашиванием (7).

Примеры и ссылки см. в Приложении.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter, Inc. в Соединенных Штатах и других странах.

Определения символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

	Spetsifikatsioonid
Spetsiifilisus	CD4
Kloon	13B8.2
Hübriidloom	NS1 x balb/c
Immunogeen	Human thymocytes
Immunoglobuliin	IgG1
Liigid	Hiir
Puhastamine	Afiinsuskromatograafia
Fluorokroom	R Phycoerythrin (PE)
Molaarsuhe	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ ergastumine	488 nm
Emission Peak	575 nm
Puhver	PBS pH 7,2 pluss 2 mg/ml BSA ja 0,1% NaN ₃

IOTest konjugeeritud antikeha CD4-PE

[REF] A07751 100 tests; 2 ml, 20 µl / analüüs

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks

KASUTUSOTSTARVE

See fluorokroomiga konjugeeritud antikeha võimaldab voolutsütomeetriaga tuvastada rakupopulatsioone, mis väljendavad inimese perifeerses veres esinevat antigeeni CD4.

PÕHIMÕTE

Analüüs põhineb spetsiifiliste monoklonaalsete antikehade võimel seonduda leukotsüütide sünteetisavate antigeensete determinantidega.

Leukotsüütide erimaseks värvimiseks tuleb proovi koos tootesarja IOtest reagentiga inkubeerida. Seejärel eemaldatakse erütrotsüüdid lüüsimisega ja pärast seda analüüsitakse voolutsütomeetriaga leukotsüüte, mida see protsess ei mõjuta.

Läbivoolutsütomeeter mõõdab valguse hajumist ja rakkude fluorestsentsi. See muudab võimalikuks huvialuse populatsiooni piiristamise histogrammil määratud elektroonilisel alal. Histogramm korreleerib valguse ortogonaalset hajumist (külghajumine ehk KH) ja kitsasnurga valguse hajumist (edasihajumine ehk EH). Teisi histograme, kus ühendatakse tsütomeetrias saadaolevat kahte parameetrit, võib kasutada lüüsimisetapis olenevalt kasutaja valitud rakendusest.

Piiritletud rakkude fluorestsentsi analüüsitakse, et eristada positiivselt värvitud sündmusi värvimata sündmustest. Tulemusi kajastatakse positiivsete sündmuste protsentuaalse osakaaluna kõigi värvdamisega hõivatud sündmuste suhtes.

NÄITEID KASUTUSEST MEDITSIINIS

See reaktiiv võimaldab CD4+ lümfotsüütide rakupopulatsioonide iseloomustamist järgmiste immuunsüsteemi haiguste korral: AIDS (1) ja muu immuunpuudulikkus, autoimmuunhaigused (2), ülitundlikkusreaktsioonid, viirusinfektsioonid, immuunvastuse taastamine pärast luuüdi ja/või elundi siirdamist. CD4+ rakupopulatsioonide (3) jälgimine ja fenotüübi määramine pahaloomulistes vere düskraasiates (nt leukeemia ja lümfoomi) korral.

REAGENDID

Kontsentratsioon: vaadake partiispetsiifilist analüüsisertifikaati aadressil www.beckmancoulter.com.

HOIATUS JA ETTEVAATUSABINÕUD

1. Ärge kasutage reagenti pärast aegumiskuupäeva.
2. Ärge külmutage.
3. Enne kasutamist laske tasakaalustuda toatemperatuuriga (18–25 °C).
4. Minimeerige kokkupuudet valgusega.
5. Vältige reagentide mikroobidega saastumist, vastasel juhul võite saada valed tulemused.
6. Antikehade lahuseid, mis sisaldavad naatriumasiidi (NaN₃), tuleb käsitseda ettevaatlikult. See pole mõeldud seepidiseks kasutamiseks. Vältige kokkupuudet naha, limaskestast ja silmadega.
Lisaks võib naatriumasiid moodustada happelises keskkonnas potentsiaalselt ohtliku hüdrasoonhappe. Kui see tuleb kõrvaldada, on soovitatav lahjendada reagenti suure hulga veega, enne kui see äravoolusüsteemi valada, et vältida plahvatusohtu ja naatriumasiidi kogunemist metalltorudesse.
7. Kõiki vereproove tuleb pidada potentsiaalselt nakkusohtlikeks ja käsitseda ettevaatusega (kasutage kaitsekindaid, kitlit ning kaitseprille).
8. Ärge pipeteerige suuga ning vältige proovide kokkupuudet naha, limaskestast, silmade ja riietega.
9. Verekatsetid ja käitlemiseks kasutatav ühekordselt kasutatav materjal tuleb hävitada põletamiseks ettenähtud spetsiaalsetes konteinerites.
10. Reagentid ja jäätmed tuleb kõrvaldada vastavalt kohalikele nõuetele.

GHS-I OHUKLASSIFIKATSIOON

Ei ole klassifitseeritud ohtlikuks



Ohutuskaart on kättesaadav veebilehel beckman.com/techdocs

SÄILITAMINE JA STABIILSUS

Enne ja pärast viaali avamist tuleb konjugeeritud vedeliku vorme hoida temperatuuril 2 kuni 8 °C ja eemal päikesevalgusest.

Suletud viaali stabiilsus: vt viaalile märgitud aegumiskuupäeva.

Avatud viaali stabiilsus: reagent on stabiilne 180 päeva.

PROOVID

Veeniverd tuleb võtta steriilsete katsutitega, mis sisaldavad antikoagulandina etüleendiamiintetraatsetaadi (EDTA) soola.

Proove tuleb hoida toatemperatuuril (18–25 °C) ja neid ei tohi raputada. Proove tuleb ühtlustada seda enne näidisproovi võtmist ettevaatlikult loksutades.

Proove tuleb analüüsida 24 tunni jooksul alates veenipunktsioonist.

RIKNEMISE TUNNUSED

Igasugune muutus reagentide füüsilises välismuses võib viidata reagenti riknemisele ja seda ei tohi kasutada.

Pakendi riknemisel või kui saadud andmed näitavad muutusi toimivuses, võtke ühendust kohaliku edasimüüjaga või kirjutage alloleval meiliaadressil:

SISU

Naatriumasiidist konservant võib moodustada metallist kanalisatsioonitorudes plahvatusohtlikke ühendeid. Vt asutuse NIOSH teadaannet. Explosive Azide Hazard (Plahvatusohtliku asiidi oht) (16.8.76).

Vältimaks võimalikku asiidiühendite akumuleerimist, loputage äravoolutorusid pärast lahjendamata reagenti kõrvaldamist. Naatriumasiidi kõrvaldamine peab olema kooskõlas asjakohaste kohalike eeskirjadega.

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID

- Proovide kogumiseks vajalikud proovivõtukatsutid ja vahendid.
- Automaatpipetid ühekordselt kasutatavate otsakutega, mis võimaldavad teiselada 20, 100 ja 500 µl.
- Plastist hemolüüsi katsutid.
- Erütrotsüütide lüüsireagent koos pesemisetapiga pärast lüüsi. Analüüsinäide VersaLyse (viitenr A09777).
- Leukotsüütide fikseerimisreagent. Näide Tootesarja IOTest 3 fikseerimisreagent (viitenr A07800).
- Isotüüpiline kontroll PE: IOTesti reaktiiv (REF A07796).
- Puhver (PBS: 0,01 M naatriumfosfaat; 0,145 M naatriumkloriid; pH 7,2).
- Tsentrifuugige.
- Automaatsegisti (vibratsioonsegamise tüüpi).
- Voolutsütomeeter.

PROTSEDUUR REAGENDIGA VERSALYSE

Märkus: alltoodud protseduur kehtib standardrakenduste puhul. Proovi ja/või VersaLyse'i mahud võivad konkreetse Beckman Coulteri rakenduse puhul erineda. Sellisel juhul järgige rakenduse tehnilisi juhiseid.

Iga analüüsitud proovi kohta on peale katsuti vajalik kasutada ühte kontrollkatsutit, milles segatakse rakud isotüüpse kontrollainega (REF A07796.).

1. Lisage igasse katsutisse 20 µl spetsiifilist IOTest konjugeeritud antikeha ja igasse kontrollkatsutisse 20 µl isotüüpset kontrollainet.
2. Lisage kumbagi katsutisse 100 µl katseproovi. Keerutage katsuteid õrnalt.
3. Inkubeerige valguse eest kaitstult 15–20 minutit toatemperatuuril (18–25 °C).
4. Seejärel lüüsige vajaduse korral punaseid vereliblesid, järgides kasutatavat lüüsimisreaktiivi puudutavaid soovitusi. Kui tahate kasutada näiteks VersaLyse'i (REF A09777), vaadake selle teabelehte ja järgige eeskätt protseduuri „kaasneva fikseerimisega“, mis koosneb ettevalmistuseta prepareeritud 1 ml segu „Fix-and-Lyse“ lisamisest. Keerutage kohe üks sekund ning inkubeerige 10 minutit toatemperatuuril ja valguse eest kaitstult. Kui proov ei sisalda punaliblesid, lisada 2 ml PBS.
5. Tsentrifuugige 5 minutit toatemperatuuril kasutades sätet 150 x g.
6. Eemaldage aspiratsiooniga pealislahus.
7. Taassuspendeerige rakusade PBS-is, mille kogus on 3 ml.
8. Korra etappi 5.
9. Eemaldage aspiratsiooniga pealislahus ja taassuspendeerige rakugraanuleid vahendiga:

0,5 ml või 1 ml PBS-i ja 0,1% formaldehüüdi, kui preparaate tuleb hoida vähem kui 24 tundi. (0,1% formaldehüüdi PBS-i saamiseks tuleb lahjendada 12,5 µl IOTest 3 fiksaatorlahust (REF A07800) ja selle 10-kordset kontsentratsiooni 1 ml PBS-is).

0,5 ml või 1 ml formaldehüüdita PBS-iga, kui valmissegusid analüüsitakse 2 tunni jooksul.

Märkus: Preparaate tuleb alati hoida temperatuuril 2–8 °C ja valguse eest kaitstult.

OODATUD VÄÄRTUSED

Iga labor peab koostama võrdlusväärtuste loendi kohalikest populatsioonist pärinevate tervete doonorite grupi tulemuste põhjal. Seda tehes tuleb võtta arvesse vanust, sugu ja etnilist kuuluvust ning ka muid võimalikke piirkondlikke erinevusi.

Meie laborites testiti tervete täiskasvanute 50 täisvereproove, kasutades ülalkirjeldatud reaktiivi. Selle reaktiiviga saadud positiivsete huvipakkuvate juhtude tulemused on nähtavad alltoodud tabelites.

Lümfotsüüdid	Arv	Keskmine (%)	SH	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monotsüüdid	Arv	Keskmine (%)	SH	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

TOIMIMINE

Toimimisandmed saadakse, kasutades ülalkirjeldatud protseduuri 24 tunni vanustel vereproovidel, mis on kogutud steriilsetesse katsutitesse antikoagulandi EDTA naatriumsoolaga. Analüüs tehakse 2 tunni jooksul pärast immunospetsiifilist värvimist.

SPETSIIFILISUS

Monoklonaalne antikeha (mAb) 13B8.2 tuvastab epitoobi, mis asub näiteks CD4 antigeeni piirkonnas V1. Epitoopilise kaardi uurimine, kasutades molekuli tsütoplasma välisele piirkonnale suunatud mutatsioone, on näidanud, et mAb 13B8.2 fikseerumist mõjutati ainult juhul, kui mutatsioon hõlmas 88 ja/või 89 jääke (4). MAb 13B8.2 takistab HIV-1 in vitro fikseerumist. MAb 13B8.2 määra CD4-le 3. HLDA inimese leukotsüütide diferentseerumise antigeenide alasel seminaril Oxfordis, Inglismaal 1986. aastal (seminari kood: 501, osa: T) (5).

LABORISISENE KORRATAVUS

Samal päeval ja sama tsütomeetriga tehti positiivse sihtmärgi värvimise protsendi mõõtmised 12. Saadud tulemused on kokku võetud järgmises tabelis.

Positiivne siht	Arv	Keskmine (%)	SH	CV (%)
Lümfotsüüdid + CD4-PE	12	37,84	0,80	2,1

Lineaarsus

Selle reaktiivi värvimise lineaarsuse testimiseks segati omavahel positiivset rakuliini (HPBALL) ja negatiivset rakuliini (DAUDI) erinevates proportsioonides püsiva rakkude lõpparvuga, nii et positiivse/negatiivse rakuliini suhe segus jäi vahemikku 0 kuni 100%.

Alikvoodid värviti, kasutades ülalkirjeldatud protseduuri, ning arvutati välja lineaarne regressioon oodatavate ja tegelikult täheldatud väärtuste vahel.

Spetsiifilisus	Lineaarne regressioon	Lineaarsus (R ²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

PIIRANGUD

1. Voolutsütomeetria võib anda valed tulemused, kui tsütomeeter ei ole ideaalselt joondatud, kui fluorestsentsi lekkeid ei ole õigesti kompenseeritud ja kui piirkonnad ei ole hoolikalt paigutatud.
2. Soovitav on kasutada loputusega RBC-lüüsimist, kuna see reagent ei ole optimeeritud loputusega lüüsitehnikate jaoks.
3. Täpsed ja korratavad tulemused saadakse, kui kasutatavad protseduurid on kooskõlas tehnilise teabelehe ja heade laboritavadega.
4. Selle reagendi pööratud antikeha kalibreeritakse nii, et tagatud oleks parim spetsiifilise/mittespetsiifilise signaali suhe. Seetõttu on igas analüüsis oluline järgida reagendi- ja proovimahu suhet.
5. Hüperleukotsütoosi korral lahjendage verd PBS-is nii, et saadav väärtus oleks ligikaudu 5×10^9 leukotsüüti/l kohta (6).
6. Teatud haigusseisundite (näiteks raske neerupuudulikkuse või hemoglobiнопaatia) korral võib erütrotsüütide lüüsimine olla aeglane, mittetäielik või isegi võimatu. Sellisel juhul on enne värvimist soovitatav mononukleaarsete rakkude isoleerimine tihedusgradiendi (näiteks Ficoll-gradiendi) abil (7).

Vt näiteid ja viiteid lisast.

KAUBAMÄRGID

Beckman Coulter, stiliseeritud logo ning selles juhendis nimetatud ettevõtte Beckman Coulter toote- ja teenusemärgid on ettevõtte Beckman Coulter, Inc. kaubamärgid või registreeritud kaubamärgid Ameerika Ühendriikides ja teistes riikides.

Sümboli tähis

Sümbolite mõisted on kättesaadavad veebilehel beckman.com/techdocs (dokument nr B60062)

	Specifikacije
Specifičnost	CD4
Klon	13B8.2
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	Human thymocytes
Imunoglobulin	IgG1
Vrsta	Miš
Pročišćavanje	Afinitetna kromatografija
Fluorokrom	R Phycoerythrin (PE)
Molarni omjer	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ ekscitacija	488 nm
Vršna emisija	575 nm
Pufer	PBS pH 7,2 uz 2 mg/mL BSA i 0,1 % NaN ₃

IOTest Konjugirano antitijelo CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 μ L/test

Za *in vitro* dijagnostičku uporabu

NAMJENA

Ovo antitijelo konjugirano fluorokromom omogućava identifikaciju i određivanje broja stanične populacije u humanim biološkim uzorcima kod koje je izražen CD4 antigen, pomoću protočne citometrije.

NAČELO

Ovaj je test utemeljen na mogućnosti vezivanja specifičnih monoklonskih antitijela na antigenske determinante eksprimirane leukocitima.

Specifično se bojenje leukocita izvodi inkubacijom uzorka s reagensom IOtest. Eritrociti se zatim uklanjaju liziranjem, a leukociti, na koje ovaj proces ne utječe, analiziraju se protočnom citometrijom.

Citometar toka mjeri difuziju svjetlosti i fluorescenciju stanica. Omogućuje razgraničavanje promatrane populacije unutar elektroničkog prozora definiranog na histogramu, koji stvara korelaciju između ortogonalne difuzije svjetlosti (bočnog raspršenja (BR)) i difuzije uskokutne svjetlosti (prednjeg raspršenja (PR)). Drugi histogrami koji kombiniraju dva od više različitih parametara dostupnih na citometru mogu se upotrebljavati kao pomoć u fazi ograđivanja ovisno o primjeni koju je odabrao korisnik.

Analizira se fluorescencija ograničenih stanica da bi se pozitivno obojeni događaji odvojili od neobojenih. Rezultati se izražavaju kao postotak pozitivnih događaja u odnosu na sve događaje dobivene ograđivanjem.

PRIMJERI KLINIČKIH PRIMJENA

Ovaj reagens dopušta karakterizaciju populacije CD4+ limfocitnih stanica u poremećajima imunološkog sustava kao što su AIDS (1) i ostale imunodeficiencije, autoimunološki poremećaji (2), preosjetljivost, virusne infekcije te prilikom ponovnog uspostavljanja imunološke reakcije nakon transplantacije koštane srži i/ili organa. Praćenje i fenotipizacija populacija CD4+ stanica (3) u malignim krvnim diskrazijama, kao što su leukemija i limfom.

REAGENSI

Koncentracija: Podatak o koncentraciji potražite na certifikatu analize (Certificate of Analysis) specifičnom za svaku seriju na www.beckmancoulter.com

UPOZORENJE I MJERE OPREZA

1. Reagens nemojte upotrebljavati nakon isteka roka trajanja.
2. Nemojte zamrzavati.
3. Prije upotrebe pustite da dosegne sobnu temperaturu (18 – 25 °C).
4. Smanjite izlaganje svjetlu.
5. Izbjegavajte mikrobnu kontaminaciju reagensa ili može doći do netočnih rezultata.
6. Otopinama antitijela koje sadrže natrijev azid (NaN₃) potrebno je rukovati oprezno. Ne gutajte i izbjegavajte dodir s kožom, sluznicom i očima. Štoviše, natrijev azid u kiselom mediju može formirati potencijalno opasnu hidrazoičnu kiselinu. Ako je reagens potrebno odložiti u otpad, preporučuje se da ga razrijedite u velikoj količini vode prije nego što ga izlijete u odvodni sustav da biste izbjegli nakupljanje natrijeva azida u metalnim cijevima i spriječili opasnost od eksplozije.
7. Svi uzorci krvi moraju se smatrati potencijalno zaraznima te je njima potrebno rukovati oprezno (odnosno nositi zaštitne rukavice, odjeću i naočale).
8. Pipetu nikad ne dodirujte ustima, a uzorke držite podalje od kože, sluznice i očiju.
9. Epruvete s krvlju i otpadni materijal za rukovanje treba odložiti u jednokratne spremnike namijenjene za spaljivanje.
10. Reagense i otpad potrebno je ukloniti u skladu s lokalnim zahtjevima.

KLASIFIKACIJA OPASNOSTI PREMA GHS-U

Nije klasificiran kao opasan



Sigurnosno-tehnički list dostupan je na adresi beckman.com/techdocs

POHRANA I STABILNOST

Nakon otvaranja reagensa, konjugirane tekuće oblike obvezno je čuvati na temperaturama od 2 do 8 °C i zaštititi od svjetlosti.

Stabilnost zatvorene bočice: pogledajte datum isteka roka valjanosti na bočici.

Stabilnost otvorene bočice: reagens je stabilan 180 dana.

UZORCI

Venska krv mora se uzeti sterilnim epruvetama koje kao antikoagulans sadrže EDTA sol.

Uzorke držite na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C) i nemojte ih tresti. Prije uzimanja testnog uzorka potrebno je homogenizirati uzorke pažljivim mućkanjem.

Uzorci venske krvi moraju se analizirati u roku od 24 sata od njihova uzimanja.

DOKAZ PROPADANJA

Svaka promjena fizičkog izgleda reagensa može upućivati na propadanje te se reagens ne smije upotrebljavati.

U slučaju propadanja pakiranja ili ako dobiveni podaci pokazuju neke izmjene performansi, molimo Vas da se obratite lokalnom distributeru ili koristite sljedeću adresu e-pošte:

SADRŽAJ

Konzervans s natrijevim azidom može stvoriti eksplozivne spojeve u metalnim cjevovodima. Pogledajte bilten NIOSH: Explosive Azide Hazard (Opasnost od eksplozije azida) (16. 8. 76.).

Da biste spriječili moguće taloženje komponenata azida, prilikom odlaganja nerazrijeđenog reagensa u otpad odvodne cijevi isperite vodom. Odlaganje natrijeva azida u otpad mora biti u skladu s odgovarajućim lokalnim propisima.

POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU DIO KOMPLETA:

- Epruvete za uzorke i materijal potreban za uzimanje uzoraka.
- Automatske pipete s jednokratnim nastavcima za 20, 100 i 500 µL.
- Plastične hemolitičke epruvete.
- Reagens za liziranje eritrocita s fazom pranja nakon liziranja. Na primjer: VersaLyse (ref. A09777).
- Reagens za fiksiranje leukocita. Na primjer: Otopina za fiksiranje IOTest 3 (ref. A07800).
- Izotipska kontrola: PE: IOTest reagens. (Ref. A07796).
- Pufer (PBS: 0,01 M natrijeva fosfata, 0,145 M natrijeva klorida, pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatska miješalica (tip vorteks).
- Citometar toka.

POSTUPAK S REAGENSOM VERSALYSE

NAPOMENA: Postupak se odnosi na standardnu aplikaciju. Uzorak i/ili volumen VersaLyse reagensa za određene Beckman Coulter aplikacije mogu biti različiti. U tom slučaju trebate slijediti upute na priručnom letku.

Za svaki analizirani uzorak, uz testnu epruvetu, potrebno je osigurati jednu kontrolnu epruvetu u kojoj se stanice miješaju uz prisutnost izotipske kontrole (Ref. A07796).

- Dodajte 20 µL specifičnog IOTest sjedinjenog protutijela u svaku testnu epruvetu i 20 µL izotipske kontrole u svaku kontrolnu epruvetu.
- Dodajte 100 µL testnog uzorka u obje epruvete. Vortex mikserom nježno promiješajte epruvete.
- Inkubirajte od 15 do 20 min na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C), zaštićeno od svjetlosti.
- Izvršite lizu crvenih krvnih stanica, ako je potrebno, sljedeći preporuke na reagensu za lizu koji koristite. Npr., ako koristite VersaLyse (Ref. A09777), pogledajte priručni letak i slijedite upute za postupak nazvan "with concomitant fixation (s konkomitantnom fiksacijom)" koji uključuje dodavanje 1 mL "Fix-and-Lyse" smjese pripremljene na licu mjesta. Miješajte Vortex mikserom koju sekundu i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla. Ako uzorak ne sadrži crvene krvne stanice, dodajte 2 mL PBS-a.
- Centrifugirajte 5 min pri 150 x g na sobnoj temperaturi.
- Uklonite supernatant aspiracijom.
- Stanična zrnca ponovno pretvorite u suspenziju s pomoću 3 mL PBS-a.
- Ponovite korak 5.
- Uklonite supernatant aspiracijom i stanična zrnca ponovno pretvorite u suspenziju s pomoću:

0,5 mL ili 1 mL PBS-a plus 0,1 % of formaldehida ako će se pripravci manje od 24 sati. (0,1 % formaldehida PBS-a se može dobiti razrjeđivanjem 12,5 µL IOTest 3 otopine za fiksaciju (Ref. A07800) u njezinu 10X koncentraciju u 1 mL PBS-a).

0,5 mL ili 1 mL PBS-a bez formaldehida, ako pripravak treba analizirati u roku od 2 sati.

Napomena: U svakom slučaju pripreme čuvajte zaštićene od svjetlosti na temperaturi između 2 i 8 °C.

OČEKIVANE VRIJEDNOSTI

Svaki laboratorij obavezan je sastaviti popis referentnih vrijednosti temeljenih na skupini zdravih donatora iz lokalne populacije. Dob, spol i pripadnost određenoj etničkoj skupini kao i ostale lokalne regionalne razlike moraju se uzeti u obzir.

On Istog dana na istom citometru, napravljeno je 12 mjerenja postotak pozitivno obojenih stanica. Dobiveni rezultati sažetisu u sljedećoj tablici.

Limfociti	Broj	Srednja vrijednost (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monociti	Broj	Srednja vrijednost (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

PERFORMANSE

Podaci o djelovanju dobiveni su pomoću gore opisanog postupka na 24 sata starim uzorcima krvi prethodno prikupljenoj sterilnim epruvetama s EDTA soli kao antikoagulansom. Analiza je obavljena unutar 2 sata nakon imunološkog bojenja.

SPECIFIČNOST

Monoklonsko antitijelo (mAb) 13B8.2 prepoznaje epitop koji se nalazi na V1 području sličnom imunoglobulinu CD4 antigena. Istraživanje karte epitopa, u kojem su korištene mutacije koje su ciljale područja izvan citoplazme molekule, pokazalo je da je fiksacija antitijela mAb 13B8.2 zahvaćena samo kada mutacija obuhvaća ostatke 88 i/ili 89 (4). Antitijelo MAb 13B8.2 inhibira in vitro fiksaciju virusa HIV-1. Antitijelo MAb13B8.2 dodijeljeno je biljegu CD4 tijekom 3. HLDA radionice o razlikovnim antigenima humanih leukocita, održane u Oxfordu (Velika Britanija) 1986. (WS šifra: 501, odjeljak: T) (5).

MEĐULABORATORIJSKA OBNOVLJIVOST

On Istog dana na istomcitometru, napravljeno je 12 mjerenja postotak pozitivno obojenih stanica. Dobiveni rezultati sažetisu u slijedećoj tablici.

Pozitivna ciljna vrijednost	Broj	Srednja vrijednost (%)	SD	CV (%)
Limfociti	12	37,84	0,80	2,1

Linearnost

Kako bi ispitili linearnost bojanja ovog reagensa, antigen-pozitivne (HPBALL) i antigen-negativne stanice (DAUDI) međusobno se pomiješaju u različitim omjerima uz konačan broj ukupnih stanica, tako da omjer pozitivnih i negativnih stanica u smjesi varira od 0 do 100 %.

Alikvoti se bojaju prema gore navedenom postupku te se izračunava linearna regresija između očekivanih i očitanih vrijednosti.

Specifičnost	Linearna regresija	Linearnost (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

OGRANIČENJA

1. Protočna citometrija može proizvesti pogrešne rezultate ako citometar nije savršeno poravnat, ako fluorescentna curenja nisu pravilno kompenzirana i ako regije nisu pažljivo pozicionirane.
2. Poželjno je koristiti tehniku za liziranje crvenih krvnih stanica s korakom ispiranja jer ovaj reagens nije optimiziran za tehniku liziranja "bez ispiranja".
3. Točni i ponovljivi rezultati dobivat će se sve dok se postupci izvode u skladu s tehničkom brošurou i u skladu s dobrim laboratorijskim praksama.
4. Konjugirano antitijelo tog reagensa kalibrirano je tako da pruža najbolji omjer specifičnog i nespecifičnog signala. Zato je važno pridržavati se omjera volumena reagensa i volumena uzorka prilikom svakog testiranja.
5. U slučaju hiperleukocitoze razrijedite uzorak u PBS-u da biste dobili vrijednost od približno 5×10^9 leukocita/L (6).
6. Pri određenim bolestima, kao što je ozbiljno zatajenje bubrega ili hemoglobinopatije, liziranje eritrocita može biti sporo, nepotpuno ili čak i nemoguće. U tom se slučaju prije bojenja preporučuje izoliranje jednojezgrenih stanica s pomoću gradijenta gustoće (na primjer, Ficoll) (7).

Za primjere i reference pogledajte Dodatak.

ŽIGOVI

Beckman Coulter, stilizirani logotip te oznake proizvoda i usluga tvrtke Beckman Coulter žigovi su ili registrirani žigovi tvrtke Beckman Coulter, Inc. u Sjedinjenim Američkim Državama i drugim državama.

Pojmovnik simbola

Pojmovnik simbola dostupan je na web-mjestu beckman.com/techdocs (broj dokumenta B60062)

	Спецификации
Специфичност	CD4
Клонинг	13B8.2
Хибридома	NS1 x balb/c
Имуноген	Human thymocytes
Имуноглобулин	IgG1
Вид	Мишка
Пречистване	Афинитетна хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
Моларно съотношение	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ възбуждане	488 nm
Емисионен пик	575 nm
Буфер	PBS pH 7,2 плюс 2 mg/mL BSA и 0,1 % NaN ₃

ЮТест **Конюгирано антитяло** **CD4-PE**

REF A07751 100 tests; 2 mL, 20 µL/тест

За *ин витро* диагностика

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Това конюгирано с флуорохром антитяло позволява идентифициране и изброяване на клетъчни популации, експресиращи CD4 антиген в човешки биологични проби чрез флуоцитометрия.

ПРИНЦИП

Този тест се базира на способността на специфични моноклонални антитела да се свързват с антигенни детерминанти, експресирани от левкоцитите.

Специфично оцветяване на левкоцитите се извършва чрез инкубиране на пробата с реактива ЮТест. След това червените кръвни телца се отстраняват чрез лизиране, а левкоцитите, които не се повлияват от този процес, се анализират чрез поточна цитометрия.

Поточният цитометър измерва разсейването на светлината и флуоресценцията на клетките. Това прави възможно разграничаването на популацията, която се изследва, в електронния прозорец, дефиниран на една хистограма, която корелира с ортогоналната дифузия на светлината (странично разсейване) и дифузията на тесногълна светлина (предно разсейване). Други хистограми, комбиниращи два от различните параметри на разположение на цитометъра, могат да бъдат използвани като основа в етапа на определяне на област за анализ в зависимост от приложението, избрано от потребителя.

Флуоресценцията на разграничените клетки се анализира, за да се разграничат позитивно оцветените събития от неочетените такива. Резултатите се изразяват като процент на положителни събития във връзка с всички събития, получени от определянето на областта за анализ.

ПРИМЕРИ ЗА КЛИНИЧНИ ПРИЛОЖЕНИЯ

Този реактив позволява характеризация на лимфоцитните клетъчни популации CD4+ при нарушения на имунната система: СПИН (1) и друга имунна недостатъчност, автоимунни нарушения (2), реакции на свръхчувствителност, вирусни инфекции, възстановяване на имунната реакция след трансплантация на костен мозък и/или органи. Проследяване и определяне на фенотипа на клетъчни популации CD4+ (3) при злокачествена кръвна дискразия като левкемия и лимфоми.

РЕАКТИВИ

Концентрация: Вижте конкретния сертификат за анализ на адрес www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Не използвайте реактива след изтичане на срока на годност.
2. Не замразявайте.
3. Оставете на стайна температура (18–25°C) преди употреба.
4. Минимизирайте излагането на светлина.
5. Избягвайте микробно замърсяване на реактивите, в противен случай е възможно да се получат погрешни резултати.
6. С разтворите на антитела, съдържащи натриев азид (NaN₃), трябва да се работи внимателно. Не приемайте вътрешно и избягвайте всякакъв контакт с кожата, лигавицата и очите.

В допълнение, в киселинна среда натриевият азид може да образува потенциално опасната хидразеоена киселина. Ако тя трябва да се изхвърли, препоръчва се реактивът да се разрежи в голям обем вода, преди да се излее в дренажната система, за да се избегне натрупването на натриев азид в металните тръби и да се предотврати риск от експлозия.

7. Всички кръвни проби трябва да се считат за потенциално заразни и с тях трябва да се борави внимателно (по-специално: носене на защитни ръкавици, облекло и очила).
8. Никога не пипетирайте с уста и избягвайте всякакъв контакт с кожата, лигавиците, очите и дрехите.
9. Епруветките за кръв и материалите за еднократна употреба, използвани за боравене, трябва да се изхвърлят във временни контейнери, предназначени за изгаряне.
10. Реактивите и отпадъците трябва да бъдат елиминирани в съответствие с местните изисквания.

КЛАСИФИЦИЯ НА ОПАСНОСТИТЕ ПО GHS

Не е класифициран като опасен

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ

Конюгираните течни форми трябва да се съхраняват при 2 до 8°C и да не се излагат на светлина преди и след отваряне на флакона.

Стабилност на затворен флакон: вижте срока на годност на флакона.

Стабилност на отворен флакон: реактивът е стабилен за 180 дни.

ПРОБИ

Венозна кръв трябва да се взема в стерилни епруветки, съдържащи сол EDTA като антикоагулант.

Пробите трябва да бъдат съхранявани при стайна температура (18–25°C) и не трябва да се разклащат. Пробите трябва да бъдат хомогенизирани чрез внимателно смесване, преди да се вземе пробата за теста.

Пробите трябва да бъдат анализирани в рамките на 24 часа от венепунктурата.

ДАНИ ЗА ВЛОШАВАНЕ

Всяка промяна във физическия изглед на реактивите може да е признак за влошаване и реактивът не трябва да бъде използван.

В случай на влошаване на опаковката или ако получените данни показват някаква промяна в работата, моля, свържете се с местния си дистрибутор или използвайте следния електронен адрес:

СЪДЪРЖАНИЕ

Консервантът натриев азид може да образува експлозивни съединения в метални отводнителни тръбопроводи. Вижте Бюлетина на NIOSH: Explosive Azide Hazard (Бюлетин на Националния институт по безопасност и хигиена на труда: Опасност от експлозия на азид) (16/8/76).

За да избегнете възможно натрупване на азидни съединения, промивайте канализационните тръби с вода след изхвърляне на неразтворен реактив. Изхвърлянето на натриев азид трябва да бъде в съответствие с местните разпоредби.

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СА ДОСТАВЕНИ С КОМПЛЕКТА:

- Епруветки за проби и материали, необходими за вземане на проби.
- Автоматични пипети с крайници за еднократна употреба за 20, 100 и 500 µL.
- Пластмасови хемолитични епруветки.
- Реактив за лизис на червени кръвни телца с етап на отмиване след лизис. Например: VersaLyse (Реф. A09777).
- Реактив за левкоцитна фиксация. Например: IOTest 3 фиксиращ разтвор (Реф. A07800).
- изотипна контрола PE : IOTest reagent.(кат № A07796.).
- Буфер (PBS: 0,01 M натриев фосфат; 0,145 M натриев хлорид; pH 7,2).
- Центрофугирайте.
- Автоматичен агитатор (тип вортекс).
- Поточен цитометър.

ПРОЦЕДУРА С РЕАКТИВ VERSALYSE

ЗАБЕЛЕЖКА: Процедурата по-долу е валидна за стандартни приложения. Обемите на пробата и / или VersaLyse за някои Beckman Coulter приложения могат да се различават. В такъв случай следвайте указанията от техническата брошура на приложението.

За всеки анализиран материал, освен епруветка с пробата се изисква една контролна епруветка, в която клетките се смесват с избраната изотипна контрола (Ref. A07796.).

1. Добавете 20 от специфичното конюгирано анти тяло за IOTest към всяка тестова епруветка и 20 µL от изотипната контрола към всяка контролна епруветка.
2. Добавете 100 µL от пробата за изследване към 2-те епруветки. Вортексирате епруветките внимателно.
3. Инкубирайте за 15 до 20 минути при стайна температура (18–25°C), като предпазвате от светлина.
4. След това лизирайте еритроцитите, ако е необходимо, като следвате препоръките за използвания лизиращ реагент. Като пример, ако искате да използвате VersaLyse (кат № A09777), следвайте за предпочитане инструкциите в листовката по процедурата "с едновременно фиксиране", която се състои от добавяне на 1 mL на "Fix-and-Lyse" смес, приготвена непосредствено преди употреба. Вортексирате веднага за една секунда и инкубирайте 10 минути при стайна температура, защитени от светлина. Ако пробата не съдържа еритроцити, се добавят 2 mL PBS.
5. Центрофугирайте 5 минути при 150 x g при стайна температура.
6. Отстранете надутаечната течност чрез аспирация.
7. Разтворете отново клетъчната утайка, като използвате 3 mL PBS.
8. Повторете стъпка 5.
9. Отстранете надутаечната течност чрез аспирация и ресуспендирайте клетъчната утайка с:

0,5 mL или 1 mL PBS плюс 0,1 % формалдехид, ако препаратите трябва да бъдат съхранявани по-малко от 24 часа. (PBS с 0,1 % формалдехид може да се получи чрез разреждане на 12,5 µL IOTest 3 фиксиращ разтвор (REF A07800) с концентрация 10X в 1 mL PBS).

0,5 mL или 1 mL PBS без формалдехид, ако препаратите ще бъдат анализирани в рамките на 2 часа.

Забележка: Във всички случаи съхранявайте препаратите при температури между 2 и 8°C и защитени от светлина.

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

Всяка лаборатория трябва да състави списък с референтни стойности въз основа на група от здрави донори от местното население. При това трябва да се вземат предвид възраст, пол и етническа група, както и всякакви други потенциални регионални различия.

В нашите лаборатории, проби от периферна кръв от 50 здрави възрастни бяха третирани с описания по-горе реактив. Получените резултати за броя на положителните за този реактив събития, са дадени в таблицата по-долу:

Лимфоцити	Брой	Средна (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Моноцити	Брой	Средна (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

РАБОТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Данните за работата се получават чрез гореописаната процедура, която се извършва на 24-часови кръвни проби, предварително взети в стерилни епруветки със соли на етилендиаминтетраоцетната киселина като антикоагулант. Анализ се извършва в рамките на 2 часа след имунооцветяването.

СПЕЦИФИЧНОСТ

Моноклоналното антитяло (mAb) 13B8.2 разпознава епитоп, разположен в Ig-подобния V1 район на CD4 антиген. Проучване на картата на епитопа чрез използване на мутации, насочени към извън- цитоплазмени региони на молекулата показват, че фиксирането на mAb 13B8.2 се повлиява само, когато мутацията въвлеча 88 и / или 89 остатък (4). Mab 13B8.2 инхибира ин витро фиксацията на HIV-1. Mab13B8.2 е отнесено към CD4 по време на третия HLDA Семинар за човешки левкоцитни диференциационни антигени, проведен в Оксфорд, Англия, през 1986 г. (WS код: 501, раздел Т) (5).

ВЪТРЕЛАБОРАТОРНА ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ

В един и същи ден и използвайки един и същи флуцитометър бяха извършени 12 измервания на процента на позитивни прицелни лимфоцити в кръв, взета от един донор. Получените резултати са обобщени в следната таблица:

Положителна цел	Брой	Средна (%)	SD	CV (%)
Лимфоцити CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Линейност

За да се тества линейността на оцветяване от този реактив, положителна клетъчна линия ((HPBALL)) и отрицателна клетъчна линия ((DAUDI)) бяха смесени в различни пропорции с постоянен краен брой на клетките, така че съотношението положителна линия / негативна линия в сместа варираше от 0 до 100 %.

Съизмерими количества бяха оцветени по описаната по горе процедура и беше изчислена линейната регресия между очакваните стойности и наблюдаваните стойности.

Специфичност	Линейна регресия	Линейност (R2)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Поточната цитометрия може да даде неточни резултати, ако цитометърът не е бил идеално приравнен, ако течове на флуоресценция не са били правилно компенсирани или ако регионите не са били внимателно позиционирани.
- За предпочитане е да се използва метод с лизиране на еритроцити с последващо промиване, тъй като този реактив не е оптимизиран за метода "лизиране без миене".
- Ще бъдат получени точни и възпроизводими резултати, при условие, че използваните процедури са в съответствие с техническата листовка и са съвместими с добрите лабораторни практики.
- Конюгираното антитяло на този реактив е калибрирано, за да се осигури най-доброто съотношение между специфичен сигнал/неспецифичен сигнал. Затова е важно да се придържате към съотношението обем на реактива/обем на пробата във всеки тест.
- В случай на хиперлевкоцитоза кръвта се разрежда в PBS, така че да се получи стойност приблизително 5×10^9 левкоцити/L (6).
- При определени болестни състояния, например тежка бъбречна недостатъчност или хемоглобинопатии, лизирането на червените кръвни телца може да бъде бавно, непълно или дори невъзможно. В този случай се препоръчва да се изолират мононуклеарни клетки, като се използва градиент на плътността (Ficoll например) преди оцветяване (7).

Вижте Приложението за примери и справки.

ТЪРГОВСКИ МАРКИ

Beckman Coulter, стилизираното лого и марките на продуктите и услугите на Beckman Coulter, присъстващи в този документ, са търговски марки или регистрирани търговски марки на Beckman Coulter, Inc. в САЩ и в други държави.

Легенда на символите

Речник на символите е наличен на beckman.com/techdocs (номер на документа B60062)

	規格
專一性	CD4
轉殖	13B8.2
融合瘤	NS1 x balb/c
免疫原	Human thymocytes
免疫球蛋白	IgG1
物種	小鼠
純化	親和力層析法
螢光染料	R Phycoerythrin (PE)
莫耳比率	PE/Ig : 0.5 - 1.5
λ 激發	488 nm
發射峰	575 nm
緩衝劑	PBS pH 7.2 加 2 mg/mL BSA 及 0.1% NaN ₃

IOTest 結合抗體 CD4-PE

[REF] A07751 100 次檢測；2 mL, 20 µL/測試

體外診斷使用

預期用途

該螢光染料結合抗體用於透過流式細胞術對人體生物檢體中表達 CD4 抗原的細胞群進行鑑定和計數。

原理

本測試的基礎在於特異性單株抗體結合由白血球表現之抗原決定簇的能力。

以 IOTest 試劑與檢體反應，對白血球進行特異性染色。然後以溶解作用去除紅血球，而白血球不受此程序影響，並可透過流式細胞分析儀器進行分析。

流式細胞分析儀器可測量細胞的光漫射和螢光。這樣可以界定直方圖上定義的電子窗口內的目標群體，直方圖可以關聯光的正交漫射（側向角散射，即 SS）和窄角光的漫射（前向角散射，即 FS）。細胞分析儀器上可用之結合兩個不同參數的其他直方圖，可用於支持圈選階段，這取決於使用者所選的應用。

為了區分陽性染色事件和未染色事件，對劃定細胞的螢光進行了分析。結果表示為陽性事件相對於圈選所得全部事件的百分比。

臨床應用範例

透過該試劑可以鑑定免疫系統疾病中的 CD4+ 淋巴細胞群：AIDS (1) 及其他免疫缺陷、自體免疫疾病 (2)、過敏反應、病毒感染、骨髓和/或器官移植後的免疫反應恢復。對惡性血質不調（例如白血病和淋巴瘤）中的 CD4+ 細胞群 (3) 進行追蹤和表型分析。

試劑

濃度：若要獲取批次特定分析證書，請造訪 www.beckmancoulter.com。

警告和預防措施

- 請勿使用過期試劑。
- 切勿冷凍。
- 使用前，請將其恢復至室溫 (18~25°C)。
- 儘量避免陽光直射。
- 請避免試劑受到微生物污染，否則可能會出現錯誤結果。
- 含有疊氮化鈉 (NaN₃) 的抗體溶液應謹慎處理。請勿內服，並避免接觸皮膚、黏膜和眼睛。
此外，在酸性介質中，疊氮化鈉可形成具有潛在危害的疊氮酸。若需要對其進行處置，建議在試劑倒入排水系統前以大量清水稀釋，避免疊氮化鈉在金屬管道中累積並預防爆炸。
- 所有血液檢體必須視為具有潛在傳染性，且必須小心處理（務必穿戴防護手套、防護衣和護目鏡）。
- 切勿用嘴吸液，並避免檢體接觸皮膚、黏膜和眼睛。
- 用於處理的血液試管和一次性材料應放入焚化專用的特殊容器中處置。
- 應根據當地要求清除試劑和廢棄物。

GHS 危害分類

未歸類為危險物質



安全性資料表載於 beckman.com/techdocs

存儲和穩定性

在打開試劑瓶前後，結合液體必須存放在 2-8°C 的條件下且要避光。

未開封試劑瓶的穩定性：請參閱瓶身的有效期。

開瓶後穩定性：試劑穩定性可維持 180 天。

樣本

靜脈血必須使用無菌試管抽取，此無菌試管中含有 EDTA 鹽作為抗凝劑。
檢體應存放在室溫 (18~25°C)，且不得搖晃。取用測試檢體前，應將檢體輕輕攪動，使之均勻化。
檢體必須在靜脈穿刺後 24 小時內進行分析。

變質的證據

試劑外觀的任何變化表示可能發生變質，因此不應使用該試劑。
如果包裝發生損壞或所得結果顯示有性能改變，請聯絡您當地的經銷商或使用以下電子郵件地址：immuno-techsup@beckmancoulter.com

內容物

疊氮化鈉防腐劑可能會在金屬排水管道中形成爆炸性化合物。請參閱 NIOSH Bulletin：Explosive Azide Hazard (爆炸性疊氮化物危害) (76/8/16)。
為防止疊氮化合物可能累積，丟棄未稀釋的試劑後請用水沖洗污水管。必須依照相關當地法規丟棄疊氮化鈉。

試劑盒未提供但卻需要的材料：

- 採樣時需要採樣試管和材料。
- 帶有可吸取 20、100 和 500 µL 一次性吸頭的自動移液器。
- 塑膠溶血試管。
- 用於溶解後洗滌階段的紅血球溶解試劑。舉例：VersaLyse (參考 A09777)。
- 白血球固定試劑。舉例：IOTest 3 固定液 (參考 A07800)。
- 同型質控品 PE：IOTest 試劑 (REF A07796)。
- 緩衝劑 (PBS：0.01 M 磷酸鈉；0.145 M 氯化鈉；pH 7.2)。
- 離心機。
- 自動攪拌器 (漩渦型)。
- 流式細胞分析儀器。

使用 VERSALYSE 試劑的程序

注意：以下程序對標準應用有效。某些貝克曼庫爾特應用的檢體和/或 VersaLyse 體積可能不同。如果出現這種情況，請遵循應用技術手冊上的說明。
對於已分析的每種檢體，除使用試管外，還需要使用一個質控品試管，以在其中混合細胞與同型質控品 (REF A07796)。

- 向每個試管中添加 20 µL 特异性 IOTest 結合抗體，並向每個質控品試管中添加 20 µL 同型質控品。
- 向兩個試管中添加 100 µL 檢測檢體。輕輕漩渦振蕩試管。
- 在室溫 (18~25°C) 下避光反應 15~20 分鐘。
- 然後遵循裂解試劑使用建議，將紅血球裂解 (如有必要)。例如，若您要使用 VersaLyse (REF A09777)，請參閱說明書，最好按照名為「同時固定」的程序操作，其包含添加臨時製備的 1 mL「固定加裂解」混合物。立即漩渦振蕩一秒，並在室溫條件下避光培育 10 分鐘。若檢體中不包含紅血球，加入 2 mL 的 PBS。
- 在室溫下以 150 x g 離心 5 分鐘。
- 吸除上清液。
- 使用 3 mL PBS 重新懸浮細胞團塊。
- 重複第 5 步。
- 吸除上清液並按照以下方式重新懸浮細胞團塊：

0.5 mL 或 1 mL PBS 加 0.1% 甲醛，若備品存放不到 24 小時。(可透過在 1 mL PBS 中稀釋 10X 濃度的 12.5 µL IOTest 3 固定液 (REF A07800) 獲取含 0.1% 甲醛的 PBS)。

若製劑將在 2 小時內分析，使用 0.5 mL 或 1 mL PBS (無甲醛)。

註：在所有情況下，將製劑在 2~8°C 避光保存。

預期值

每個實驗室必須編製一份參考值清單，參考值應基於當地群體的一組健康捐贈者。編製參考值清單時必須考慮年齡、性別、族群以及任何其他潛在的地域差異。

在我們的實驗室中，採用上述試劑處理 50 名健康成人的全血檢體。使用該試劑進行陽性目標事件計數得到的結果如下表所示：

淋巴球	數量	平均值 (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55.91	10.82	19.4

單核細胞	數量	平均值 (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90.86	4.97	5.47

性能

對於之前採集在無菌試管 (含有 EDTA 鹽作為抗凝劑) 中達 24 小時的血液檢體，使用上面描述的程序獲取了性能資料。在免疫染色後的 2 小時內進行分析。

專一性

單株抗體 (mAb) 13B8.2 可識別位於 CD4 抗原的免疫球蛋白樣 V1 區的表位。使用標靶為分子細胞質外區的突變進行的表位作圖研究表明，只有當突變涉及 88 和/或 89 殘基時，mAb 13B8.2 的固定才會受到影響 (4)。MAb 13B8.2 可抑制 HIV-1 的體外固定。在 1986 年於英國牛津舉行的 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (第 3 屆 HLDA 人類白細胞分化抗原會議) (會議代碼：501，T 部分) 上，將 MAb13B8.2 指定到 CD4 中 (5)。

實驗室內再現性

在同一天使用同一細胞分析儀對陽性目標的染色百分比進行 12 次測定。所得結果如下表所示：

陽性目標	數量	平均值 (%)	SD	CV (%)
淋巴細胞 +CD4-PE	12	37.84	0.80	2.1

線性

為了檢測該試劑的染色線性，將陽性細胞株 (HPBALL) 與陰性細胞株 (DAUDI) 以不同的比例混合 (最終的細胞數目不變)，使混合物的陽性細胞株/陰性細胞株比率範圍為 0 到 100%。

根據上述程序對分裝檢體進行染色，並計算期望值與觀測值之間的線性回歸。

專一性	線性回歸	線性 (R²)
CD4-PE	Y = 1 X - 0.38	0.9998

限制條件

- 1. 流式細胞分析儀器在下列情況下可能產生錯誤結果：細胞分析儀器未正確校正、螢光洩漏未正確補償、相關區域並未仔細定位。
- 2. 最好採用帶洗滌步驟的紅血球裂解方法，因該試劑不能在「無洗滌」裂解方法中取得最佳效果。
- 3. 按照技術手冊採用相關流程並遵循優良實驗室操作規範，便可得到準確且可重複的結果。
- 4. 此試劑的結合抗體已經過校正，以提供最佳的特異性訊號/非特異性訊號比率。因此，在每次測試中遵守試劑體積/檢體體積比率很重要。
- 5. 如果白血球過多，請在 PBS 中稀釋血液，使白血球濃度約為 5 x 10⁹ 顆/L (6)。
- 6. 在嚴重腎衰竭、血色素病變等特定疾病狀態中，紅血球溶解可能會變得緩慢、不完全，甚至無法溶解。在這種情況下，建議在染色前使用密度梯度 (例如聚蔗糖) 分離單核球 (7)。

請參閱附錄以閱讀舉例和參考文獻。

商標

Beckman Coulter、徽標以及本文述及的貝克曼庫爾特公司產品和服務標記是美國貝克曼庫爾特有限公司在美國和其他國家的商標或註冊商標。

符號釋義

符號術語表請參見網站：beckman.com/techdocs (文件編號 B60062)

	Specificații
Specificitate	CD4
Clonă	13B8.2
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	Human thymocytes
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia de afinitate
Fluorocrom	R Phycoerythrin (PE)
Raport molar	PE/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	575 nm
Soluție tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

IOTest Anticorp conjugat CD4-PE

REF A07751 100 de teste; 2 ml, 20 µl/test

Pentru diagnosticare *in vitro*

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea și enumerarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD4 prezent în probele biologice umane cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOTest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul în flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de aplicația aleasă de către utilizator.

Fluorescența celulelor delimitate se analizează pentru distingerea evenimentelor colorate pozitiv de cele necolorate. Rezultatele sunt exprimate ca procentaj de evenimente pozitive în raport cu toate evenimentele obținute de gating.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Acest reactiv permite caracterizarea populațiilor de celule limfocitice CD4+ în bolile sistemului imunitar: SIDA (1) și alte deficiențe imunitare, boli autoimune (2), reacții de hipersensibilitate, infecții virale, restaurarea răspunsului imun după transplantul de măduvă și/sau organ. Urmărirea și fenotiparea populațiilor de celule CD4+ (3) în discraziile maligne de sânge cum ar fi leucemii și limfoame.

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. Nu utilizați reactivul după data expirării.
2. Nu congelați.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. A nu se ingera și a se evita contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare pentru a evita acumularea de azidă de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele pentru sânge și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminați în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos



Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs

DEPOZITAREA ȘI STABILITATEA

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea fiolei sigilate: consultați data expirării de pe fiolă.

Stabilitatea fiolei desigilate: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la punctia venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CONȚINUT

Azida de sodiu folosită drept conservant poate forma compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați buletinul informativ al NIOSH: Explosive Azide Hazard (Azidă cu risc de explozie) (08/16/76).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 20, 100 și 500 µl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (ref. A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: Soluție de fixare IOTest 3 (ref. A07800).
- Ser de control izotipic PE: reactiv IOTest (REF A07796)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 mol de fosfat de sodiu; 0,145 mol de clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugați.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURA CU REACTIVUL VERSALYSE

Observație: procedura de mai jos este valabilă pentru aplicații standard. Volumele de probe și/sau VersaLyse pentru anumite aplicații Beckman Coulter pot fi diferite. Într-un astfel de caz, urmați instrucțiunile din prospect tehnic al aplicației.

Pentru fiecare probă analizată, în afară de eprubeta de testare, este necesară o eprubetă de control în care celulele sunt amestecate în prezența serului de control izotipic (REF A07796).

- În fiecare eprubetă, adăugați 20 µl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 20 µl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
- Adăugați 100 µl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
- Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
- De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină. În cazul în care proba nu conține celule roșii, se adaugă 2 ml de PBS.
- Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
- Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
- Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
- Repetăți pasul 5.
- Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml sau 1 ml de PBS plus 0,1% formaldehidă dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 ore. (O soluție PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținută prin diluarea unei cantități de 12,5 µl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml sau 1 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 (de) ore.

Observație: În toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

VALORI PRECONIZATE

Fiecare laborator trebuie să alcătuiască o listă de valori de referință pe baza unui grup de donatori sănătoși din populația locală. Acest lucru trebuie realizat prin luarea în considerare a vârstei, sexului și grupului etnic, precum și a oricărei alte posibile diferențe regionale.

În laboratoarele noastre, probele de sânge integral de la 50 adulți sănătoși au fost tratate utilizându-se reactivul descris mai sus. Rezultatele obținute pentru numărul de evenimente pozitive de interes cu acest reactiv sunt date în tabelele de mai jos:

Limfocite	Număr	Medie (%)	SD (deviație standard)	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocite	Număr	Medie (%)	SD (deviație standard)	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

PERFORMANȚĂ

Datele de performanță se obțin folosindu-se procedeul descris mai sus pe probe de sânge vechi de 24 de ore recoltate anterior în eprubete sterile cu sare EDTA ca anticoagulant. Analiza se efectuează în decurs de 2 ore de la imunocolorare.

SPECIFICITATE

Anticorpul monoclonal (mAb) 13B8.2 recunoaște un epitop situat în regiunea V1 de tip Ig din antigenul CD4. Un studiu al hărții epitopice utilizând mutații care urmăresc regiuni extra-citoplasmice ale moleculei a demonstrat că fixarea mAb 13B8.2 a fost afectată numai atunci când mutația implica reziduuri 88 și/sau 89 (4). MAb 13B8.2 împiedică fixarea in vitro a HIV-1. MAb13B8.2 a fost asociat cu CD4 cu ocazia celui de-al treilea simpozion internațional consacrat antigenilor umani de diferențiere a leucocitelor (3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens), desfășurat la Oxford, în Marea Britanie, în 1986 (cod WS: 501, secțiunea: T) (5).

REPRODUCTIBILITATE INTRALABORATOR

În aceeași zi și utilizându-se același citometru, au fost efectuate 12 măsurători ale procentajului de colorare a unei ținte pozitive. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)	SD (deviație standard)	CV (%)
Limfocite +CD4-PE	12	37,84	0,80	2,1

Liniaritate

Pentru a testa liniaritatea colorării acestui reactiv, au fost mixate o linie pozitivă de celule (HPBALL) și o linie negativă de celule (DAUDI) în diverse proporții cu un număr final constant de celule astfel încât raportul dintre linia pozitivă și cea negativă de celule să fie cuprins între 0% și 100%.

Părțile alicote au fost colorate utilizându-se procedura descrisă mai sus și s-a calculat regresia liniară între valorile așteptate și valorile observate.

Specificitate	Regresie liniară	Liniaritate (R ²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpul conjugat din acest reactiv este calibrat astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific/semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv/volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/l (6).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (7).

Consultați Anexa pentru exemple și referințe.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specifikacije
Specifičnost	CD4
Klon	13B8.2
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	Human thymocytes
Imunoglobulin	IgG1
Vrste	Miš
Prečišćavanje	Afinitetna hromatografija
Fluorohrom	R Phycoerythrin (PE)
Molarni odnos	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ ekscitacija	488 nm
Vršna vrednost emisije	575 nm
Pufer	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA i 0,1% NaN ₃

IOTest

Konjugovano antitelo

CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 ml, 20 µl/testu

Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu

NAMENA

Ovo fluorohromno-konjugovano antitelo omogućava identifikaciju i numeraciju populacije ćelija izražavajući CD4 prisustvo antigena u ljudskim biološkim uzorcima pomoću protočne citometrije.

PRINCIP

Ovaj test se zasniva na sposobnosti određenih monoklonskih antitela da se vežu za antigenske determinante eksprimirane leukocitima.

Specifično bojenje leukocita se obavlja inkubiranjem uzorka sa reagensom IOtest. Eritrociti se zatim uklanjaju liziranjem, a leukociti, na koje ovaj proces ne utiče, analiziraju se protočnom citometrijom.

Protočni citometar meri difuziju svetlosti i fluorescenciju ćelija. On omogućava razgraničenje populacije od interesa u okviru elektronskog prozora definisanog na histogramu, što je u korelaciji sa ortogonalnom difuzijom svetlosti (bočno rasejanje ili SS) i difuzijom uskojgaone svetlosti (prednje rasejanje ili FS). Drugi histogrami koji kombinuju dva različita parametra koja postoje na citometru mogu se koristiti kao podrška u fazi regulacije, u zavisnosti od primene koju je korisnik odabrao.

Fluorescencija ograničenih ćelija se analizira kako bi se razlikovali pozitivno obojeni događaji od neobojenih događaja. Rezultati su prikazani kao procenat pozitivnih događaja u odnosu na sve događaje dobijene regulacijom.

PRIMERI KLINIČKIH PRIMENA

Ovaj reagens dozvoljava karakterizaciju ćelijskih populacija CD4+ limfocita u poremećajima imunog sistema: AIDS (1) i drugi imunološki defekti, autoimuni poremećaji (2), hipersenzitivne reakcije, virusne infekcije, obnavljanje imunog odgovora nakon transplantacije koštane srži i/ili organa. Praćenje i fenotipizacija ćelijskih populacija CD4+ limfocita (3) u malignim krvnim diskrazijama kao što su leukemije i limfomi.

REAGENSI

Koncentracija: Pogledajte Sertifikat analize specifičan za ovu seriju na www.beckmancoulter.com.

UPOZORENJE I MERE OPREZA

1. Ne koristite reagente nakon isteka roka trajanja.
2. Ne zamrzavajte.
3. Pre upotrebe sačekajte da se približi sobnoj temperaturi (18–25°C).
4. Izbegavati izloženost svetlosti.
5. Sprečite mikrobsku kontaminaciju reagenasa ili se mogu javiti netačni rezultati.
6. Rastvorima antitela koji sadrže natrijum azid (NaN₃) treba pažljivo rukovati. Ne uzimajte interno i izbegavajte svaki dodir sa kožom, sluzokožom i očima. Pored toga, u kiselj sredini, natrijum azid može formirati potencijalno opasnu hidrazoinisku kiselinu. Ako je potrebno da se odloži u otpad, preporučuje se da se reagens razblaži u velikoj zapremini vode pre sipanja u sistem kanalizacije kako bi se izbeglo taloženje natrijum azida u metalnim cevima i sprečila opasnost od eksplozije.
7. Svi uzorci krvi moraju se smatrati potencijalno infektivnim i njima se mora pažljivo rukovati (posebno: nošenje zaštitnih rukavica, odeće i zaštitnih naočara).
8. Nikada ne izvlačite ustima i izbegavajte svaki kontakt uzoraka sa kožom, sluzokožom i očima.
9. Epruvete za uzorak krvi i potrošni materijal koji je korišćen za rukovanje treba odložiti u ad hoc kontejnere predviđene za spaljivanje.
10. Reagente i otpad treba ukloniti prema lokalnim zahtevima.

GHS KLASIFIKACIJA OPASNOSTI

Nije klasifikovano kao opasno



Bezbednosni list je dostupan na adresi beckman.com/techdocs

SKLADIŠTENJE I STABILNOST

Konjugovani tečni oblici se moraju čuvati na temperaturi između 2 i 8°C i zaštićeni od svetla, pre i nakon otvaranja bočice.

Stabilnost zatvorene bočice: pogledajte rok trajanja na bočici.

Stabilnost otvorene bočice: reagens je stabilan 180 dan(a).

UZORCI

Uzorci iz venske krvi moraju se uzimati sterilnim epruvetama koje sadrže EDTA so kao antikoagulans.

Uzorke treba čuvati na sobnoj temperaturi (18–25°C) i ne tresti. Uzorke treba pre uzimanja uzorka za testiranje homogenizovati blagim mešanjem.

Uzorci se moraju analizirati u roku od 24 sati od venepunkcije.

DOKAZI POGORŠANJA

Bilo koja promena u fizičkom izgledu reagensa može ukazivati na pogoršanje i reagens ne treba koristiti.

U slučaju dotrajalosti/pogoršanja stanja pakovanja ili ako dobijeni podaci ukazuju na promenu učinka, kontaktirajte svog lokalnog prodavca ili koristite sledeću adresu e-pošte:

SADRŽAJ

Konzervans sa natrijum azidom može formirati eksplozivna jedinjenja u metalnim odvodnim vodovima. Pogledajte „NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard“ (16.8.76.) (Bilten Nacionalnog instituta za bezbednost i zdravlje na radu: Opasnost od eksplozivnih azida).

Da biste sprečili moguće taloženje jedinjenja azida, isperite cevi za otpad vodom nakon odlaganja u otpad nerazblaženog reagensa. Odlaganje u otpad natrijum azida mora biti u skladu sa odgovarajućim lokalnim propisima.

POTREBNI MATERIJALI KOJI SE NE ISPORUČUJU UZ KOMPLET:

- Epruvete za uzorkovanje i materijal potreban za uzorkovanje.
- Automatske pipete sa nastavcima za jednokratnu upotrebu za 20 100 µl i 500 µl.
- Plastične epruvete za hemolizu.
- Reagens za liziranje eritrocita sa fazom ispiranja nakon liziranja. Na primer: VersaLyse (referentni broj A09777).
- Reagens za fiksiranje leukocita. Na primer: IOTest 3 fiksativni rastvor (referentni broj A07800).
- Izotipska kontrola PE: IOTest reagens (REF A07796).
- Pufer (PBS: 0,01 M natrijum-fosfat; 0,145 M natrijum-hlorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatska mešalica (vrtložnog tipa).
- Protočni citometar.

POSTUPAK SA VERSALYSE REAGENSOM

Napomena: Postupak naveden u nastavku važi za standardne primene. Zapremine uzorka i/ili VersaLyse reagensa za određene Beckman Coulter primene se mogu razlikovati. U tom slučaju, pratite instrukcije na tehničkom uputstvu za primenu.

Za svaki analiziran uzorak je pored epruvete za testiranje potrebna i jedna kontrolna epruveta za uzorak u kojoj se ćelije mešaju u prisustvu izotipske kontrole (REF A07796.).

1. Dodajte 20 µl specifičnih IOTest konjugovanih antitela svakoj probnoj epruveti, i 20 µl izotipske kontrole svakoj kontrolnoj epruveti.
2. Dodajte 100 µl uzorka za testiranje u obe epruvete za uzorak. Pažljivo izmešajte epruvete za uzorak u vrtložnoj mešalici.
3. Inkubirajte 15 do 20 minuta na sobnoj temperaturi (18–25°C), zaštićeno od svetlosti.
4. Zatim izvršite liziranje crvenih krvnih ćelija prateći preporuke za korišćeni reagens za liziranje, ukoliko je to potrebno. Na primer, ako želite da koristite VersaLyse (REF A09777) pogledajte uputstvo i po mogućnosti sledite postupak pod nazivom „uz istovremeno fiksiranje“, koji se sastoji od dodavanja 1 ml „Fix-and-Lyse“ smeše pripremljene na licu mesta. Odmah izmešajte u vrtložnoj mešalici jednu sekundu i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti. Ako uzorak ne sadrži crvene krvne ćelije, dodajte 2 ml PBS-a.
5. Centrifugirajte 5 minuta na 150 x g na sobnoj temperaturi.
6. Uklonite supernatant aspiracijom.
7. Ponovo suspendujte talog ćelija u 3 ml PBS-a.
8. Ponovite korak 5.
9. Aspiracijom uklonite supernatant i ponovo suspendujte talog ćelija u:
0,5 ml ili 1 ml PBS-a plus 0,1% formaldehida, ako će se preparati čuvati kraće od 24 sati. (PBS sa 0,1% formaldehida se može dobiti razređivanjem 12,5 µl IOTest 3 fiksativnog rastvora (REF A07800) sa njegovom 10X koncentracijom u 1 ml PBS-a).
0,5 ml ili 1 ml PBS-a bez formaldehida ako će se preparati analizirati u roku od ovog broja sati – 2.

Napomena: U svim slučajevima preparate čuvajte na temperaturi između 2°C i 8°C i zaštićene od svetlosti.

OČEKIVANE VREDNOSTI

Svaka laboratorija mora sastaviti listu referentnih vrednosti zasnovanih na grupi zdravih donora iz lokalne populacije. To se mora obaviti uzimajući u obzir starost, pol i etničku grupu, kao i bilo koje druge moguće regionalne razlike.

U našim laboratorijama, uzorci pune krvi 50 zdravih odraslih osoba su tretirani pomoću prethodno opisanog reagensa. Rezultati dobijeni za broj pozitivnih događaja od interesa sa ovim reagensom navedeni su u tabelama u nastavku:

Limfociti	Broj	Srednja vrednost (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monociti	Broj	Srednja vrednost (%)	SD	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

PERFORMANSE

Podaci o delovanju dobijeni su pomoću prethodno opisanog postupka na 24 sata starim uzorcima krvi koji su prethodno prikupljeni sterilnim epruvetama za uzorke sa EDTA solju kao antikoagulansom. Analiza se vrši u roku od 2 sata od imunobojenja.

SPECIFIČNOST

Monoklonoalno antitelo (mAb) 13B8.2 prepoznaje epitop koji se nalazi na Ig-sličnom V1 regionu CD4 antigena. Studija epitopske mape, koja koristi mutacije usmerene na ekstra-citoplazmične regione molekula pokazala je da je uticaj na fiksiranje mAb 13B8.2 postojao tek kada je mutacija uključivala 88 i/ili 89 ostataka (4). MAb 13B8.2 inhibira „in vitro“ fiksiranje HIV-1. MAb13B8.2 je pridružen CD4 tokom radionice „3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ (Treća HLDA konferencija o ljudskim antigenima leukocitne diferencijacije), koja je održana u Oksfordu, u Engleskoj, 1986. godine (Kod WS: 501, Odeljak: T) (5).

MEĐULABORATORIJSKA REPRODUKTIVNOST

Istog dana i upotrebom istog citometra, izvršena su 12 merenja procenta bojenja pozitivnog cilja. Dobijeni rezultati su dati u sledećoj tabeli:

Pozitivan cilj	Broj	Srednja vrednost (%)	SD	CV (%)
Limfociti +CD4-PE	12	37,84	0,80	2,1

Linearnost

Da bi se testirala linearnost bojenja ovog reagensa, pozitivna ćelijska linija (HPBALL) i negativna ćelijska linija (DAUDI) su mešane u različitim proporcijama sa konstantnim konačnim brojem ćelija, tako da se odnos pozitivne ćelijske linije i negativne ćelijske linije u mešavini kretao od 0 do 100%.

Alikvoti su obojeni pomoću prethodno opisanog postupka i izračunata je linearna regresija između očekivanih vrednosti i dobijenih vrednosti.

Specifičnost	Linearna regresija	Linearnost (R ²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

OGRANIČENJA

1. Protočna citometrija može proizvesti netačne rezultate ako citometar nije pravilno postavljen, ako fluorescentna curenja nisu ispravno kompenzirana ili ako regionu nisu pažljivo postavljani.
2. Poželjno je da koristite tehniku RBC lize sa korakom za ispiranje jer ovaj reagens nije optimizovan za tehniku lize „bez ispiranja“.
3. Tačni i ponovljivi rezultati će se dobijati sve dok su korišćeni postupci u skladu sa listom sa tehničkim podacima i postupci kompatibilni sa smernicama dobre laboratorijske prakse.
4. Konjugovano antitelo ovog reagensa je kalibrisano tako da ponudi najbolji odnos specifičnog i nespecifičnog signala. Prema tome, važno je u svakom testu koristiti utvrđeni odnos zapremine reagensa i zapremine uzorka.
5. U slučaju hiperleukocitoze, razredite krv u PBS-u kako biste dobili vrednost od približno 5×10^9 leukocita/l (6).
6. U određenim stanjima bolesti, kao što su teška bubrežna insuficijencija ili hemoglobinopatije, liziranje eritrocita može biti sporo, nepotpuno ili čak nemoguće. U tom slučaju se pre bojenja preporučuje izoliranje mononuklearnih ćelija upotrebom gradijenta gustine (na primer, ficol) (7).

Za primere i referentne materijale pogledati Dodatak.

ŽIGOVI

Beckman Coulter, stilizovani logotip i Beckman Coulter robni i servisni žigovi koji se navode u ovom dokumentu jesu žigovi ili registrovani žigovi kompanije Beckman Coulter, Inc. u Sjedinjenim Američkim Državama i drugim zemljama.

Ključ za simbole

Rečnik simbola je dostupan na adresi beckman.com/techdocs (broj dokumenta B60062)

	Specifikācijas
Specifika	CD4
Klons	13B8.2
Hibridoma	NS1 x balb/c
Imunogēns	Human thymocytes
Imūnglobulīns	IgG1
Suga	Peļe
Attīrīšana	Afinitātes hromatogrāfija
Fluorohroms	R Phycoerythrin (PE)
Molārā attiecība	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ ierosme	488 nm
Izstarojuma lielākā vērtība	575 nm
Buferšķīdums	PBS pH 7,2 ar 2 mg/ml BSA un 0,1 % NaN ₃

IOTest
Konjugētā antiViela
CD4-PE

REF A07751 100 testi; 2 ml, 20 µl uz testu

In vitro diagnostikas lietošanai

PAREDZĒTĀ LIETOŠANA

Ar fluorohromu saistītā antiViela nodrošina tādu šūnu populāciju noteikšanu un aprēķināšanu, kam ir CD4 antigēna ekspresija un kas ir cilvēka bioloģiskajos paraugos, izmantojot plūsmas citometriju.

PRINCIPS

Šī testa pamatā ir specifisku monoklonālu antiVielu spēja saistīties ar leikocītu izdalītām antigēnu determinantēm.

Leikocītu specifiskā iekrāsošana tiek veikta, inkubējot paraugu ar IOTest reaģentu. Pēc tam eritrocīti tiek atdalīti lizēšanas procesā, un leikocīti, ko šis process neietekmē, tiek analizēti, izmantojot plūsmas citometriju.

Plūsmas citometrs mēra gaismas difūziju un šūnu fluorescenci. Tādēļ ir iespējama interesējošās populācijas ierobežošana elektroniskajā logā, kas definēts histogrammā, kas korelē ar gaismas ortogonālo difūziju (šānu izkliede jeb SS) un šaurleņķa gaismas difūziju (priekšējā izkliede jeb FS). Kā papildu metodes sinhronizācijas procesā iespējams izmantot citas histogrammas, kurās iespējams kombinēt divus dažādus citometrā pieejamos parametrus atkarībā no lietotāja izvēlētā izmantojuma.

Tiek analizēta atdalīto šūnu fluorescences, lai atšķirtu pozitīvi iekrāsotos notikumus no neiekrāsotajiem. Rezultāti tiek izteikti kā procentuālais lielums no pozitīviem notikumiem attiecībā pret visiem notikumiem, kas iegūti selekcijā.

KLĪNISKO PIELIETOJUMU PIEMĒRI

Šis reaģents ļauj raksturot CD4+ limfocītisko šūnu populācijas šādu imūnsistēmas saslimšanu gadījumos: AIDS (1) un citi imūndeficīti, autoimūnās saslimšanas (2), hipersensitivitātes reakcijas, vīrusu infekcijas, imūnreakciju atjaunošana pēc kaulu smadzeņu un/vai orgānu transplantācijas. Turpmāki pasākumi un CD4+ šūnu populāciju fenotipēšana (3) ļaundabīgu asins diskrāziju, piemēram, leikēmijas un limfomas, gadījumos.

REAĢENTI

Koncentrācija: skatiet konkrētai partijai atbilstošo analīzes sertifikātu vietnē www.beckmancoulter.com.

BRĪDINĀJUMI UN PIESARDZĪBAS PASĀKUMI

1. Neizmantojiet reaģentu pēc derīguma termiņa beigām.
2. Nedrīkst sasaldēt.
3. Pirms izmantošanas ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai (18–25 °C).
4. Minimizējiet ekspozīciju gaismas iedarbībai.
5. Izvairieties no reaģentu bakteriālas kontaminācijas, jo iespējami viltus rezultāti.
6. Strādājot ar antiVielu šķīdumiem, kuru sastāvā ir nātrija azīds (NaN₃), jāievēro piesardzība. Neizmantojiet iekšķīgi un nepieļaujiet saskari ar ādu, gļotādu un acīm.

Turklāt skābā vidē nātrija azīds var radīt potenciāli bīstamo hidrazoīdskābi. Ja to nepieciešams izmest, reaģentu ieteicams šķīdināt lielā daudzumā ūdens un izliet to kanalizācijas sistēmā, lai novērstu nātrija azīda uzkrāšanos metāla caurulēs un novērstu sprādziena risku.
7. Visi asins paraugi ir jāuzskata par potenciāli infekcioziem, un ar tiem jārīkojas, ievērojot piesardzību (respektīvi, jāvalkā aizsargcimdi, aizsargtērpi un brilles).
8. Nekad neizmantojiet muti, lai darbotos ar pipeti. Paraugi nedrīkst saskarties ar ādu, gļotādu un acīm.
9. Darbā izmantotās asiņu mēģenes un vienreizlietojamie materiāli ir jāizmet ad hoc konteineros, kas paredzēti sadedzināšanai.
10. Ir jāveic reaģentu un atkritumu utilizācija atbilstoši vietējām prasībām.

KĪMISKO VIELU KLASIFICĒŠANAS UN MARKĒŠANAS VISPĀRĒJI SASKAŅOTĀS SISTĒMAS BĪSTAMĪBAS KLASIFIKĀCIJA

Nav klasificēts kā bīstams



Drošības datu lapa ir pieejama vietnē: techdocs.beckman.com

GLABĀŠANA UN STABILITĀTE

Konjugētās šķidrās formas ir jāuzglabā 2–8 °C un jāsargā no gaismas pirms un pēc flakona atvēršanas.

Aizvērta flakona stabilitāte: skatiet uz flakona norādīto derīguma termiņu.

Atvērta flakona stabilitāte: reaģents ir stabils 180 dienas.

PARAUGI

Venozās asinis jāņem, izmantojot sterilas mēģenes, kurās kā antikoagulants ir izmantots EDTA sāls.

Paraugi ir jāuzglabā istabas temperatūrā (18–25 °C), un tos nedrīkst sakratīt. Pirms testa parauga ņemšanas ir jāveic paraugu homogenizācija, viegli saskalojot paraugus.

Paraugu analīze ir jāveic 24 stundu laikā pēc vēnas punkcijas.

SADALĪŠANĀS PAZĪMES

Jebkuras reaģentu pazīmju izmaiņas var norādīt, ka reaģents sadalās un to nedrīkst izmantot.

Ja iepakojums ir sadalījies vai iegūtajos datos ir novērojamas veikspējas izmaiņas, sazinieties ar vietējo izplatītāju vai izmantojiet tālāk norādīto e-pasta adresi: immuno-techsup@beckmancoulter.com

SATURS

Nātrija azīda konservants var izveidot sprādzienbīstamus savienojumus metāla notekcaurulēs. Skatīt NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (NIOSH biļetens: Azīdu sprādzienbīstamība) (16.8.76.).

Lai nepieļautu iespējamo azīda savienojumu uzkrāšanos, pēc neatšķaidītā reaģenta izmešanas izskalojiet kanalizācijas caurules ar ūdeni. Nātrija azīda izmešana ir jāveic saskaņā ar atbilstošajiem vietējiem noteikumiem.

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NEIETILPST KOMPLEKTĀ

- Paraugu ņemšanai nepieciešamās mēģenes un materiāli.
- Automātiskās pipetes ar vienreizlietojamiem uzgaļiem, kas paredzētas 20, 100 un 500 µl.
- Plastmasas hemolīzes mēģenes.
- Eritrocītu lizēšanas reaģents ar mazgāšanas fāzi pēc lizēšanas. Piemērs: VersaLyse (ats. A09777).
- Leikocītu fiksācijas reaģents. Piemērs: IOTest 3 fiksatīvais šķīdums (ats. A07800).
- Izotipēšanas kontrole PE: IOTest reaģents (REF A07796).
- Buferšķīdums (PBS: 0,01 M nātrija fosfāta; 0,145 M nātrija hlorīda; pH 7,2).
- Centrifugējiet.
- Automātisks maisītājs (samaisišanas tipa).
- Plūsmas citometrs.

PROCEDŪRA AR REAĢENTU VERSALYSE

Piezīme. Tālāk norādītā procedūra ir derīga standarta pielietojumam. Parauga un/vai VersaLyse tilpums noteiktam Beckman Coulter pielietojumam var atšķirties. Šādā gadījumā ievērojiet norādījumus pielietojuma tehniskajā lietošanas instrukcijā.

Katram analizējamam paraugam papildus parauga mēģenei nepieciešams izmantot vienu kontroles mēģeni, kurā šūnas tiek sajauktas izotipēšanas kontroles klātbūtnē (REF A07796).

1. Pievienojiet katrai parauga mēģenei 20 µl specifiskās IOTest saistītās antivielas un 20 µl izotipēšanas kontroles katrai kontroles mēģenei.
2. Pievienojiet 100 µl analizējamā parauga abām mēģenēm. Saudzīgi saskaliniet mēģenes.
3. Inkubējiet 15–20 minūtes istabas temperatūrā (18–25 °C), sargājot no gaismas.
4. Piemēram, ja vēlaties izmantot VersaLyse (REF A09777), skatiet lietošanas instrukciju, un ir vēlams izmantot procedūru „ar vienlaikus fiksāciju”, kas tiek veikta, pievienojot 1 ml īpaši sagatavota „Fiksēšana un lizēšanas” maisījuma. Nekavējoties izmantojiet Vortex metodi uz vienu sekundi un inkubējiet mēģeni 10 minūtes istabas temperatūrā, sargājot to no gaismas iedarbības. Ja paraugs nesatur eritrocīti, pievieno 2 ml PBS.
5. Centrifugējiet 5 minūtes istabas temperatūrā, izmantojot 150 x g.
6. Aspirējot noņemiet virsējo slāni.
7. Atkārtoti šķaidiet šūnu centrifugātu ar 3 ml PBS.
8. Atkārtojiet 5. darbību.
9. Aspirējot noņemiet virsējo slāni un atkārtoti šķaidiet šūnu centrifugātu, izmantojot:
0,5 ml vai 1 ml PBS un 0,1 % formaldehīda, ja preparāts ir paredzēts uzglabāt mazāk nekā 24 stundas. (0,1 % formaldehīda PBS var iegūt, 1 ml PBS šķīduma izšķīdinot 12,5 µl IOTest 3 fiksatīvā šķīduma (REF A07800) 10 x koncentrācijā).
0,5 ml vai 1 ml PBS bez formaldehīda, ja ir paredzēts analizēt sagataves 2 stundu laikā.

Piezīme. Sagatavotos maisījumus vienmēr uzglabājiet 2–8 °C temperatūrā un sargājiet no gaismas.

PAREDZAMĀS VĒRTĪBAS

Katrai laboratorijai jāapkopo atsaucēs vērtību saraksts, pamatojoties uz veseliem vietējās populācijas donoriem. Tas jā dara, ņemot vērā vecumu, dzimumu un etnisko piederību, kā arī citas iespējamās reģionālās atšķirības.

Mūsu laboratorijās tika apstrādāti 50 veselu pieaugušo pilnasins paraugi, izmantojot iepriekš aprakstīto reaģentu. Ar šo reaģentu iegūtie interesējošo pozitīvo gadījumu rezultāti skaitliskā veidā ir sniegti tālāk tabulās:

Limfocīti	Numurs	Aritmētiskais vidējais (%)	SN	Variācijas koeficients (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Monocīti	Numurs	Aritmētiskais vidējais (%)	SN	Variācijas koeficients (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

VEIKTSPĒJA

Veiktspējas dati tiek iegūti, izmantojot iepriekš aprakstīto procedūru ar 24 stundu veciem asins paraugiem, kas iepriekš paņemti sterilās mēģenēs ar EDTA sāli un antikoagulantu. Analīze tiek veikta 2 stundu laikā pēc imunoloģiskās krāsošanas.

SPECIFIKA

Monoklonālā antiViela (mAb) 13B8.2 atpazīst epitopu, kas izvietots Ig līdzīgajā CD4 antigēna reģionā V1. Epitopiskās kartes pētījumos, kuros izmantotas mutācijas, kas vērstas pret molekulas ekstracitoplazmas reģioniem, ir parādīts, ka mAb 13B8.2 fiksācija tiek ietekmēta tikai brīžos, kad mutācijā ir iesaistītas 88 un/vai 89 atliekas (4). MAb 13B8.2 kavē HIV-1 in vitro fiksāciju. MAb13B8.2 tika piešķirta CD4 pasākumā 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3. HLDA darbnīca saistībā ar cilvēku leukocītu diferencēšanas antivielām), kas notika Oksfordā, Anglijā,1986. gadā (WS kods 501, sekcija T) (5).

ATKĀRTOJAMĪBA LABORATORIJĀ

Tajā pašā dienā, izmantojot to pašu citometru, tika mērīts 12 iekrāsotā pozitīvā mērķa procentuālais lielums. Iegūtie rezultāti ir apkopoti tālāk redzamajā tabulā.

Pozitīvais mērķis	Numurs	Aritmētiskais vidējais (%)	SN	Variācijas koeficients (%)
Limfocīti +CD4-PE	12	37,84	0,80	2,1

Linearitāte

Lai testētu šī reaģenta iekrāsošanās linearitāti, dažādās proporcijās ar konstantu šūnu beigu skaitu tika sajaukta pozitīvu šūnu līnija (HPBALL) un negatīvu šūnu līnija (DAUDI) tā, ka pozitīvās un negatīvās šūnu līnijas attiecība maisījumā bija diapazonā no 0 līdz 100 %.

Alikvotes tika nokrāsotas, izmantojot iepriekš aprakstīto procedūru, un tika aprēķināta paredzamo vērtību un iegūto vērtību lineārā regresija.

Specifika	Lineārā regresija	Linearitāte (R²)
CD4-PE	Y = 1 X - 0,38	0,9998

IEROBEŽOJUMI

- 1. Ja citometrs nav novietots precīzi līdzeni, ja nav pareizi kompensētas fluorescences noplūdes un ja reģioni nav uzmanīgi novietoti, plūsmas citometrija var radīt viltus rezultātus.
- 2. Ir ieteicams izmantot eritrocītu lizēšanas tehniku ar mazgāšanas soli, jo šis reaģents nav optimizēts izmantošanai lizēšanas tehnikā „bez mazgāšanas”.
- 3. Iegūtie rezultāti ir precīzi un reproducējami, ja visas izmantotās procedūras tiek izpildītas atbilstoši tehniskajai lietošanas instrukcijai un ir saskaņā ar labu laboratorijas praksi.
- 4. Šī reaģenta konjugētā antiViela ir kalibrēta tā, lai nodrošinātu labāko specifiska signāla/nespecifiska signāla attiecību. Tāpēc ir ļoti svarīgi ievērot reaģenta tilpuma/parauga tilpuma attiecību katrā testā.
- 5. Hiperleikocitozes gadījumā atšķaidiet asinis ar PBS, lai iegūtā vērtība būtu apmēram 5 x 10⁹ leukocīti/l (6).
- 6. Dažos slimību stāvokļos, piemēram, izteiktas nieru mazspējas vai hemoglobīnopātijas gadījumā, eritrocītu lizēšana var būt lēna, nepilnīga vai pat neiespējama. Šajā gadījumā pirms iekrāsošanas ir ieteicams izolēt mononukleārās šūnas, izmantojot blīvuma gradientu (piemēram, Ficoll) (7).

Pielikumā skatiet piemērus un atsaucies.

PREČU ZĪMES

Beckman Coulter, stilizētais logotips un Beckman Coulter preču un pakalpojumu zīmes, kas minētas šeit, ir Beckman Coulter, Inc. preču zīmes vai reģistrētas preču zīmes Amerikas Savienotajās Valstīs un citās valstīs.

Simbolu skaidrojumi

Simbolu glosārijs ir pieejams vietnē beckman.com/techdocs (dokumenta numurs B60062)

	Специфікації
Специфічність	CD4
Клон	13B8.2
Гібридома	NS1 x balb/c
Імуноген	Human thymocytes
Імуноглобулін	IgG1
Вид	Миша
Очищення	Афінна хроматографія
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
Молярне співвідношення	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ-збудження	488 нм
Пік випромінювання	575 нм
Буфер	Розчин ФСБ рН 7,2 плюс бичачий сироватковий альбумін (BCA) 2 мг/мл та 0,1% NaN ₃

Кон'юговане антитіло IOtest CD4-PE

REF A07751 100 тестів; 2 мл, 20 мкл/тест

Для діагностики *in vitro*.

ПРИЗНАЧЕННЯ

Ці антитіла, кон'юговані з флуорохромом, дають змогу ідентифікувати та підрахувати популяції клітин, що експресують антиген CD4, присутні у біологічних зразках людини, за допомогою проточної цитометрії.

ПРИНЦИП

Цей тест базується на здатності специфічних моноклональних антитіл зв'язуватися з антигенними детермінантами, які експресуються лейкоцитами.

Специфічне забарвлення лейкоцитів здійснюється через інкубацію проби з реагентом IOtest. Еритроцити далі видаляють за допомогою лізису, а лейкоцити, на які не впливає цей процес, досліджують методом проточної цитометрії.

Проточний цитометр вимірює розсіювання світла та флуоресценцію клітин. Це робить можливим розмежування досліджуваної популяції всередині електронного вікна, що визначається на гістограмі, яка співвідносить ортогональне розсіювання світла (бічне розсіювання або Side Scatter — SS) і вузькокутове розсіювання світла (пряме розсіювання або Forward Scatter — FS). Інші гістограми, що поєднують два різні параметри, доступні на цитометрі, можна використовувати для допомоги на етапі гейтингу залежно від програми, вибраної користувачем.

Флуоресценція обмеженої популяції клітин аналізується, щоб розрізнити події з позитивно забарвленими клітинами й незабарвленими. Результати виражаються як відсоток позитивних подій відносно всіх подій, зареєстрованих за допомогою гейтингу.

ПРИКЛАДИ КЛІНІЧНИХ ЗАСТОСУВАНЬ

Цей реагент дозволяє охарактеризувати популяції лімфоцитарних клітин CD4+ при порушеннях імунної системи таких, як СНІД (1) і інші імунodefіцити, аутоімунні захворювання (2), реакції гіперчутливості, вірусні інфекції, відновлення імунної відповіді після трансплантації кісткового мозку і/або органів. Наступні заходи та фенотипування популяцій CD4+ клітин (3) при злоякісних дисक्रазіях крові, таких як лейкози і лімфоми.

РЕАГЕНТИ

Концентрація: див. сертифікат аналізу для партії на сайті www.beckmancoulter.com.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ Й ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
2. Не заморожуйте.
3. Доведіть до кімнатної температури (18–25°C) перед використанням.
4. Зведіть до мінімуму вплив світла.
5. Уникайте мікробної контамінації реагентів, інакше можуть бути отримані помилкові результати.
6. Розчини антитіл, які містять азид натрію (NaN₃), треба обробляти обережно. Не приймайте внутрішньо й уникайте будь-якого контакту зі шкірою, слизовими оболонками та очима.
Крім того, у кислому середовищі азид натрію може утворити потенційно небезпечну азотистоводневу кислоту. Якщо його потрібно утилізувати, рекомендується розвести реагент у великій кількості води перед зливанням у водостічну систему, щоб уникнути накопичення азиду натрію на поверхні металевих труб і запобігти небезпеці вибуху.
7. Усі проби крові слід розглядати як потенційно інфекційні та поводитися з ними обережно (зокрема, використовуючи захисні рукавички, халати й окуляри).
8. Ніколи не піпуйте ротом та уникайте потрапляння зразків на шкіру, слизові оболонки та в очі.
9. Пробірки для крові та одноразові матеріали, які використовуються для оброблення, слід викидати в спеціальні контейнери, вміст яких призначений для спалювання.
10. Реагенти та відходи потрібно утилізувати відповідно до місцевих вимог.

КЛАСИФІКАЦІЯ НЕБЕЗПЕКИ ЗА СИСТЕМОЮ GHS

Не класифікуються як небезпечні



Паспорт безпеки доступний на сайті beckman.com/techdocs

ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Кон'югати в рідкій формі потрібно зберігати при температурі від 2 до 8°C в захищеному від світла місці, як до, так і після відкриття флакона.

Стабільність закритого флакона: див. термін придатності на флаконі.

Стабільність після відкриття флакона: реагент стабільний 180 діб.

ПРОБИ

Венозну кров потрібно брати в стерильні пробірки, що містять ангікоагулянт — сіль ЕДТА.

Проби слід зберігати за кімнатної температури (18–25°C), і їх не слід струшувати. Перш ніж узяти пробу для тестування, проби потрібно гомогенізувати за допомогою обережного перемішування.

Проби потрібно проаналізувати не пізніше ніж через 24 години після венепункції.

ОЗНАКИ ПСУВАННЯ

Будь-яка зміна зовнішнього вигляду реагентів може вказувати на псування, і реагент не слід використовувати.

У разі пошкодження упаковки або якщо отримані дані показують деякі зміни в робочих характеристиках, зверніться до місцевого дистриб'ютора або скористайтеся цією адресою електронної пошти: immuno-techsup@beckmancoulter.com

ЗМІСТ

Консервант азид натрію може утворювати вибухонебезпечні сполуки в металевих зливних трубопроводах. Див. Бюлетень Національного інституту з охорони праці та промислової гігієни (NIOSH) Explosive Azide Hazard (Вибухонебезпечні азиди) (16.8.76).

Щоб уникнути можливого утворення сполук азиду, промийте зливні труби водою відразу після утилізації нерозведеного реагенту. Реагенти, що містять азид натрію, треба утилізувати з дотриманням відповідних місцевих норм.

ПОТРІБНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ВХОДЯТЬ У КОМПЛЕКТ

- Пробірки для проб і матеріали, потрібні для забору проб.
- Автоматичні піпетки з одноразовими наконечниками на 20, 100 і 500 мкл.
- Пластикові пробірки для гемолізу.
- Реагент для лізису еритроцитів з етапом промивання після лізису. Наприклад: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реагент для фіксації лейкоцитів. Наприклад: розчин для фіксації IOTest 3 (Ref. A07800).
- Ізотипічний контроль PE: реагент IOTest (REF A07796)
- Буфер (ФСБ: 0,01 моль фосфату натрію; 0,145 моль хлориду натрію; pH 7,2).
- Центрифугування.
- Автоматичний змішувач (типу вортекс).
- Проточний цитометр.

ПРОЦЕДУРА З РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

Примітка: описана нижче процедура дійсна для стандартних застосувань. Об'єми зразків та/або реагенту VersaLyse для деяких програм Beckman Coulter можуть відрізнятися. У такому разі дотримуйтеся інструкцій у технічному аркуші.

Для кожного аналізованого зразка на додачу до тест-пробірки необхідно використовувати одну контрольну пробірку, у якій клітини змішано в присутності ізотипічного контролю (REF A07796).

1. Додайте по 20 мкл специфічних кон'югованих антитіл IOTest у кожную тестову пробірку, і 20 мкл ізотипічного контролю в кожную контрольну пробірку.
2. Додайте по 100 мкл досліджуваного зразка в обидві пробірки. Обережно перемішайте вміст пробірок у вортексі.
3. Витримайте протягом 15–20 хвилин за кімнатної температури (18–25°C) у захищеному від світла місці.
4. Потім виконайте лізис еритроцитів, якщо необхідно, дотримуючись рекомендацій щодо реагенту для лізису, що використовується. Наприклад, якщо потрібно використовувати реагент VersaLyse (REF A09777), перегляньте вкладиш і за можливості дотримуйтеся процедури під назвою «з одночасною фіксацією», яка полягає в додаванні 1 мл суміші «Fix-and-Lyse», приготовленої безпосередньо перед використанням. Відразу перемішайте на вортексі протягом однієї секунди та витримайте протягом 10 хвилин при кімнатній температурі в захищеному від світла місці. Якщо зразок не містить еритроцитів, додають 2 мл PBS.
5. Центрифугуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин зі швидкістю 150 g.
6. Видаліть надосадову рідину аспіратором.
7. Ресуспендуйте осад клітин у 3 мл ФСБ.
8. Повторіть крок 5.
9. Видаліть надосадову рідину аспіратором і ресуспендуйте осад клітин, використовуючи наведене далі.
0,5 або 1 мл розчину PBS плюс 0,1% формальдегіду, якщо препарати необхідно зберігати менше 24 годин. (0,1% формальдегіду в розчині PBS можна отримати шляхом розведення 12,5 мкл фіксуючого розчину IOTest 3 (REF A07800) при його 10-кратній концентрації в 1 мл PBS).
0,5 мл або 1 мл ФСБ без формальдегіду, якщо препарати будуть аналізувати впродовж наступних 2 годин.

Примітка. У всіх випадках препарати слід зберігати в захищеному від світла місці за температури 2–8°C.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

У кожній лабораторії мають скласти перелік еталонних значень, отриманих для групи здорових донорів із місцевого населення. Це необхідно виконати, ураховуючи вік, стать і етнічну групу, а також будь-які інші потенційні регіональні відмінності.

У наших лабораторіях зразки цільної крові 50 здорових дорослих оброблялися з використанням реагенту, описаного вище. Отримані результати підрахунку позитивних подій, які досліджуються, із використанням цього реагенту, наведено в таблицях нижче.

Лімфоцити	Число	Середнє значення (%)	СВ	КВ (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Моноцити	Число	Середнє значення (%)	СВ	КВ (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

ЕФЕКТИВНІСТЬ

Робочі показники ефективності отримуються з використанням процедури, описаної вище, на зразках крові, які були зібрані в стерильні пробірки із сіллю EDTA, що є антикоагулянтом, та зберігалися 24 години. Аналіз проводиться протягом 2 годин після імунного фарбування.

СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Моноклональне антитіло (MAT) 13B8.2 розпізнає епітоп, розташований на домені Ig-V1 антигену CD4. Вивчення карти епітопів з використанням мутацій, націлених на позаклітинні домени молекули, показало, що фіксація MAT 13B8.2 була порушена тільки тоді, коли мутація включала залишки 88 і/або 89 (4). MAT 13B8.2 інгібує in vitro фіксацію ВІЛ-1. MAT13B8.2 було віднесено до CD4 під час третього HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Семінару HLDA з питань антигенів для диференціації лейкоцитів людини) в Оксфорді, Англія, в 1986 році (WS Code: 501, Section : T) (5).

ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНА ВІДТВОРЮВАНІСТЬ

Було проведено 12 вимірювань процентного вмісту зафарбованих клітин цільової популяції клітин проведено в той самий день і з використанням того самого цитометра. Отримані результати представлено в наведеній нижче таблиці.

Цільова позитивна популяція	Число	Середнє значення (%)	СВ	КВ (%)
Лімфоцити + CD4-PE	12	37,84	0,80	2,1

Лінійність

Щоб перевірити лінійність фарбування для цього реагенту, позитивну клітинну лінію (HPBALL) і негативну клітинну лінію (DAUDI) змішано в різних пропорціях із постійною кінцевою кількістю клітин таким чином, щоб співвідношення позитивної клітинної лінії та негативної клітинної лінії в суміші було в діапазоні від 0 до 100%.

Аліквоти фарбували за методикою, описаною вище, і обчислювали параметри лінійної регресії між очікуваними та спостереженими значеннями.

Специфічність	Лінійна регресія	Лінійність (R ²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

ОБМЕЖЕННЯ

1. Результати проточної цитометрії можуть бути помилковими, якщо вказане нижче не було виконано належним чином: вирівняно цитометр, скомпенсовано витік флуоресценції, здійснено позиціонування ділянок.
2. Бажано використовувати метод лізису еритроцитів з етапом промивання, оскільки цей реагент не оптимізовано для методів лізису «без промивання».
3. Буде отримано точні й відтворювані результати, якщо процедури застосовуються відповідно до технічної інструкції, що додається, і стандартів належної лабораторної практики.
4. Кон'юговані антитіла цього реагенту відкалібровано таким чином, щоб забезпечити краще співвідношення специфічного сигналу та неспецифічного сигналу. Тому важливо дотримуватися співвідношення об'єму реагенту та об'єму проби в кожному тесті.
5. У разі гіперлейкоцитозу кров слід розводити у ФСБ так, щоб отримати концентрацію приблизно 5×10^9 лейкоцитів/л (6).
6. У разі деяких захворювань або станів, як-от тяжка ниркова недостатність або гемоглобінопатії, лізис еритроцитів може бути повільним, неповним або навіть неможливим. У цьому разі рекомендується виділяти мононуклеарні клітини за градієнтом щільності (наприклад, з використанням фіколу) перед фарбуванням (7).

Див. приклади й посилання в додатку.

ТОРГОВЕЛЬНІ МАРКИ

Beckman Coulter, стилізований логотип, товарні знаки й сервісні марки Beckman Coulter, вказані тут, є торговельними марками або зареєстрованими торговельними марками компанії Beckman Coulter, Inc. у Сполучених Штатах Америки й інших країнах.

Список символів

Глосарій символів доступний на сайті beckman.com/techdocs (документ № B60062)

	Especificações
Especificidade	CD4
Clone	13B8.2
Hibridoma	NS1 x balb/c
Imunógeno	Human thymocytes
Imunoglobulina	IgG1
Espécie	Camundongo
Purificação	Cromatografia de afinidade
Fluorocromo	R Phycoerythrin (PE)
Razão molar	PE/Ig: 0,5 - 1,5
λ de excitação	488 nm
Pico de emissão	575 nm
Tampão	PBS com pH de 7,2 mais 2 mg/mL de BSA e 0,1% de NaN ₃

IOTest

Anticorpo conjugado CD4-PE

REF A07751 100 testes; 2 mL, 20 µL/teste

Para uso em diagnóstico *in vitro*

USO PREVISTO

Esse anticorpo conjugado com fluorocromo permite a identificação e numeração das populações de células que expressam o antígeno CD4 presente em amostras biológicas humanas utilizando a citometria de fluxo.

PRINCÍPIO

Este teste baseia-se na capacidade que os anticorpos monoclonais específicos têm de se ligarem aos determinantes antigênicos expressos por leucócitos.

A coloração específica de leucócitos é realizada incubando-se a amostra com o reagente IOTest. As hemácias são então removidas por lise e os leucócitos, que não são afetados por esse processo, são analisados por citometria de fluxo.

O citômetro de fluxo mede a difusão da luz e a fluorescência das células. Ele possibilita a delimitação da população de interesse na janela eletrônica definida por um histograma, que correlaciona a difusão ortogonal da luz (dispersão lateral ou SS) e a difusão da luz em ângulo estreito (dispersão frontal ou FS). Outros histogramas que combinam dois dos diferentes parâmetros disponíveis no citômetro podem ser utilizados como auxílio no estágio de delimitação, dependendo da aplicação escolhida pelo usuário.

A fluorescência das células delimitadas é analisada para distinguir os eventos de coloração positiva daqueles sem coloração. Os resultados são expressos como uma porcentagem dos eventos positivos em relação a todos os eventos adquiridos pela delimitação.

EXEMPLOS DE APLICAÇÕES CLÍNICAS

Esse reagente permite a caracterização de subpopulações de células linfocíticas CD4+ em distúrbios do sistema imunológico: AIDS (1) e outras imunodeficiências, distúrbios autoimunes (2), reações de hipersensibilidade, infecções virais e restauração da resposta imunológica após transplante de medula óssea e/ou de órgãos. Acompanhamento e fenotipagem de populações de células CD4+ (3) em discrasias sanguíneas malignas tais como as leucemias e os linfomas.

REAGENTES

Concentração: consulte o certificado de análise específico do lote em www.beckmancoulter.com.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Não use o reagente após o prazo de validade.
2. Não congele.
3. Deixe atingir a temperatura ambiente antes de usar (18-25°C).
4. Minimize a exposição à luz.
5. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, pois isso pode gerar falsos resultados.
6. As soluções de anticorpos contendo azida sódica (NaN₃) devem ser manuseadas com cuidado. Não utilize internamente e evite o contato com a pele, mucosas e olhos.
Além disso, em um meio ácido, a azida sódica pode formar ácido hidrazoico potencialmente perigoso. Se precisar descartar essa substância, recomenda-se que o reagente seja diluído em um grande volume de água antes de despejá-lo no sistema de drenagem para evitar o acúmulo de azida sódica nos canos de metal e o risco de explosão.
7. Todas as amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infecciosas e devem ser manipuladas com cuidado (em particular: uso de luvas, jalecos e óculos de proteção).
8. Nunca coloque a pipeta na boca e evite qualquer contato das amostras com a pele, mucosas e olhos.
9. Os tubos de sangue e o material descartável utilizado para manuseio deve ser descartado em recipientes ad hoc destinados à incineração.
10. Os reagentes e os resíduos devem ser eliminados de acordo com os requisitos locais.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO DO GHS

Não classificado como perigoso



A Folha de dados de segurança está disponível em beckman.com/techdocs

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

As formas líquidas conjugadas devem ser mantidas entre 2 e 8°C e protegidas da luz, antes e depois do frasco ter sido aberto.

Estabilidade do frasco fechado: consulte o prazo de validade no frasco.

Estabilidade do frasco aberto: o reagente é estável por 180 dias.

AMOSTRAS

Sangue venoso deve ser coletado usando tubos estéreis contendo um sal de EDTA como anticoagulante.

As amostras devem ser mantidas em temperatura ambiente (18-25°C) e não devem ser agitadas. A amostra deve ser homogeneizada por agitação suave antes que a amostra para teste seja retirada.

As amostras devem ser analisadas no prazo de 24 horas após a coleta.

EVIDÊNCIA DE DETERIORAÇÃO

Qualquer alteração no aspecto físico dos reagentes poderá indicar deterioração e o reagente não deverá ser utilizado.

No caso de deterioração da embalagem ou se os dados obtidos mostrarem alguma alteração no desempenho, entre em contato com o distribuidor local ou use o seguinte endereço de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CONTEÚDO

A azida sódica utilizada como conservante pode formar compostos explosivos em canos de escoamento metálicos. Consulte o Boletim do NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health [Instituto de segurança e saúde ocupacional dos EUA]): Explosive Azide Hazard (Perigos de explosão de azida) (16/8/76).

Para evitar o possível acúmulo de compostos de azida, enxágue os canos de escoamento com água após o descarte do reagente não diluído. O descarte da azida sódica deve ser efetuado de acordo com as normas locais apropriadas.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS COM O KIT:

- Tubos de amostra e material necessário para amostragem.
- Pipetas automáticas com pontas descartáveis para 20, 100 e 500 µL.
- Tubos plásticos de hemólise.
- Reagente de lise de hemácias com fase de lavagem após a lise. Por exemplo: Reagente VersaLyse (Ref. A09777).
- Reagente de fixação de leucócitos. Por exemplo: Solução fixadora IOTest 3 (Ref. A07800).
- Controle isotípico PE: reagente IOTest (REF A07796).
- Tampão (PBS: fosfato de sódio a 0,01 M; cloreto de sódio a 0,145 M; pH 7,2).
- Centrífuga.
- Agitador automático (tipo vórtex).
- Citômetro de fluxo.

PROCEDIMENTO COM O REAGENTE VERSALYSE

Observação: o procedimento descrito a seguir é válido para aplicações padrões. Os volumes das amostras e/ou do VersaLyse para algumas aplicações da Beckman Coulter podem ser diferentes. Se este for o caso, siga as instruções no folheto técnico da aplicação.

Para cada amostra analisada, além do tubo de teste, é necessário um tubo de controle no qual as células são misturadas na presença do controle isotípico (REF A07796.).

1. Adicione 20 µL de anticorpos conjugados de IOTest específicos a cada tubo de teste e 20 µL do controle isotípico a cada tubo de controle.
2. Adicione 100 µL da amostra de teste a ambos os tubos. Agite os tubos no vórtex cuidadosamente em vórtex cuidadosamente.
3. Incube durante 15 a 20 minutos em temperatura ambiente (18-25°C), protegido da luz.
4. Em seguida, execute a lise dos glóbulos vermelhos, se necessário, seguindo as recomendações do reagente de lise utilizado. Por exemplo, se quiser usar VersaLyse (REF A09777), consulte o folheto e siga, preferencialmente, o procedimento intitulado "com fixação concomitante", que consiste em adicionar 1 mL da mistura de "Fix-and-Lyse" preparada extemporaneamente. Agite imediatamente em vórtex por 1 segundo e incube por 10 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. Se a amostra não contiver glóbulos vermelhos, adicione 2 mL de PBS.
5. Centrifugue por 5 minutos a 150 x g em temperatura ambiente.
6. Retire o sobrenadante por aspiração.
7. Suspenda novamente o precipitado celular usando 3 mL de PBS.
8. Repita a etapa 5.
9. Retire o sobrenadante por aspiração e suspenda novamente o precipitado celular usando:
0,5 mL ou 1 mL de PBS mais 0,1% de formaldeído, se as preparações forem mantidas por menos de 24 horas. (É possível obter uma solução PBS com 0,1% de formaldeído diluindo-se 12,5 µL de Solução fixadora IOTest 3 [REF A07800] na sua concentração de 10X em 1 mL de PBS.)
0,5 mL ou 1 mL de PBS sem formaldeído, se as preparações forem analisadas dentro de 2 horas.

Nota: Em qualquer dos casos, mantenha as preparações entre 2 e 8°C e protegidas da luz.

VALORES ESPERADOS

Cada laboratório deve compilar uma lista de valores de referência com base em um grupo de doadores saudáveis da população local. Deve-se tomar em conta a idade, o sexo e o grupo étnico, bem como qualquer outra diferença regional possível.

Em nossos laboratórios, amostras de sangue total de 50 adultos saudáveis foram tratadas usando o reagente anteriormente descrito. Os resultados obtidos para a contagem de eventos de interesse positivos com este reagente são apresentados nas tabelas a seguir:

Linfócitos	Número	Média (%)	DP (Desvio padrão)	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Mon	Número	Média (%)	DP (Desvio padrão)	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

DESEMPENHO

Os dados de desempenho são obtidos usando o procedimento descrito anteriormente em amostras de sangue com 24 horas, coletadas previamente em tubos estéreis com sal de EDTA como anticoagulante. A análise é executada no prazo de 2 horas após a imunocoloração.

ESPECIFICIDADE

O anticorpo monoclonal (mAb) 13B8.2 reconhece um epítipo situado na região V1 semelhante a Ig do antígeno CD4. Um estudo do mapa epitópico, usando mutações que visam as regiões extracitoplasmáticas da molécula, demonstrou que a fixação do anticorpo monoclonal 13B8.2 era afetada apenas quando a mutação envolvia os resíduos 88 e/ou 89 (4). O anticorpo monoclonal 13B8.2 inibe a fixação in vitro do HIV-1. O anticorpo monoclonal 13B8.2 foi atribuído ao CD4 no 3º HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Workshop sobre HLDA — antígenos de diferenciação de leucócitos humanos), realizado em Oxford, Inglaterra, em 1986 (Código WS: 501, Seção: T) (5).

REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL

No mesmo dia e usando o mesmo citômetro, foram realizadas 12 medições da porcentagem de coloração de um alvo positivo. Os resultados obtidos são resumidos na tabela a seguir:

Alvo positivo	Número	Média (%)	DP (Desvio padrão)	CV (%)
Linfócitos +CD4-PE	12	37,84	0,80	2,1

Linearidade

Para testar a linearidade da coloração deste reagente, foram misturadas uma linha celular positiva (HPBALL) e uma linha celular negativa (DAUDI), em diferentes proporções, com um número final constante de células, de modo que a razão da linhagem positiva/linhagem negativa da mistura se encontrasse dentro do intervalo de 0 a 100%.

As alíquotas foram coradas usando o procedimento descrito acima e foi calculada a regressão linear entre os valores observados e os esperados.

Especificidade	Regressão linear	Linearidade (R ²)
CD4-PE	$Y = 1 X - 0,38$	0,9998

LIMITAÇÕES

1. A citometria de fluxo pode produzir resultados falsos se o citômetro não for alinhado perfeitamente, se os vazamentos de fluorescência não forem corretamente compensados e se as regiões não forem cuidadosamente posicionadas.
2. É preferível utilizar a técnica de lise de RBC com uma etapa de lavagem quando o reagente não tiver sido otimizado para técnicas de lise “sem lavagem”.
3. Serão obtidos resultados exatos e reproduzíveis desde que os procedimentos utilizados estejam em conformidade com o folheto técnico e sejam compatíveis com as boas práticas de laboratório.
4. O anticorpo conjugado desse reagente é calibrado para oferecer a melhor razão entre sinal específico e sinal não específico. Por isso, é importante manter a razão entre volume do reagente e volume da amostra em cada teste.
5. No caso de hiperleucocitose, dilua o sangue em PBS para obter um valor de aproximadamente 5×10^9 leucócitos/L (6).
6. Em certos estados da doença, como insuficiência renal grave e hemoglobinopatias, a lise das hemácias pode ser lenta, incompleta ou até mesmo impossível. Nesse caso, recomenda-se isolar as células mononucleadas usando um gradiente de densidade (Ficoll, por exemplo) antes da coloração (7).

Consulte o anexo para obter exemplos e referências.

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logotipo estilizado e as marcas dos produtos e serviços da Beckman Coulter mencionados neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e em outros países.

Legenda dos símbolos

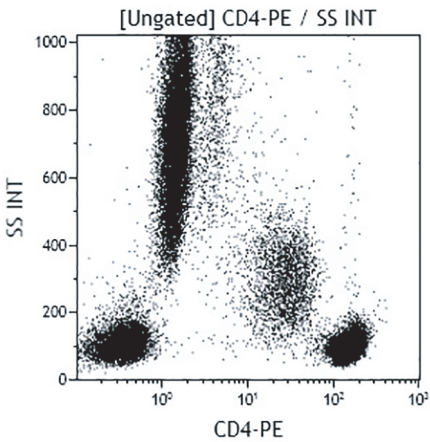
O Glossário de símbolos está disponível em beckman.com/techdocs (documento número B60062)

APPENDIX

- EXAMPLES

Staining is with IOTest CD4-PE Conjugated Antibody.

Acquisition is performed with a Beckman Coulter Navios flow cytometer equipped with the Navios analysis software.



REFERENCES

1. References: 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. Sprent, J., "T lymphocytes and the thymus", 1989, Fundamental Immunology, Chap 4, 2nd Ed., 69-93.
5. 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, 234-238.
6. H42-A2 Vol.27 No. 16. P30. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline - Second Edition.
7. Ibrahim FF, Ghannam MM, Ali FM., "Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients"., 2002. Ren Fail., Nov;24(6):779-90.

IMMUNOTECH SAS 為貝克曼庫爾特分公司, 地址: 130, Avenue de Lattre de Tassigny,

BP 177, 13276 Marseille Cedex 9, France, 電話: +(33) 4 91 17 27 27, 網站:
www.beckman.com

Beckman Coulter do Brasil Com. e Imp. de Prod. de Lab. Ltda
Alameda Rio Negro, 500, 15º andar, Torre B Alphaville Industrial
CEP 06.454-00 Barueri, São Paulo, Brasil
CNPJ: 42.160.812/0001-44 Telefone: 0800-771-8818

製造販売業者: ベックマン・コールター株式会社
〒135-0063
東京都江東区有明三丁目5番7号
TOC有明ウエストタワー

ООО «Бекмен Культер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com



IMMUNOTECH SAS A Beckman Coulter Company, 130, Avenue de Lattre de Tassigny,

BP 177, 13276 Marseille Cedex 9, France, +(33) 4 91 17 27 27
www.beckman.com