Thesis Title Development of Reagents for Enumeration of CD4 Lymphocytes in Peripheral Blood by Flow Cytometer

Author Miss Marisa Injun

M.S. Medical Technology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk	Chairman
Asst. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana	Member
Asst. Prof. Sakchai Dettrairat	Member

ABSTRACT

Enumeration of CD4 lymphocytes can be used for classifying of the status of HIV infection, disease prognosis, starting treatment and monitoring of therapy. Recently, the standard method for determining the number of CD4 lymphocytes depend on the staining of leukocytes with specific monoclonal antibodies labeled with fluorochrome and analysed by flow cytometry. Although this method is accuracy, it requires very expensive imported reagents.

In this study, the reagents for enumeration CD4 lymphocytes were developed. The established reagents consisting of FITC labeled CD4 mAb, CD14 mAb, PE labeled anti-mouse IgG and commercial PerCP labeled CD45 mAb. In the first

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

experiment, CD4 mAb (MT4) and CD14 mAb (MT14/3) were purified by affinity chromatography. Then the purified MT4 mAb was conjugated with FITC. The specificity of the labeled MT4 and MT14/3 mAbs was then verified by staining PBMC and CD4 or CD14 expressing COS cells.

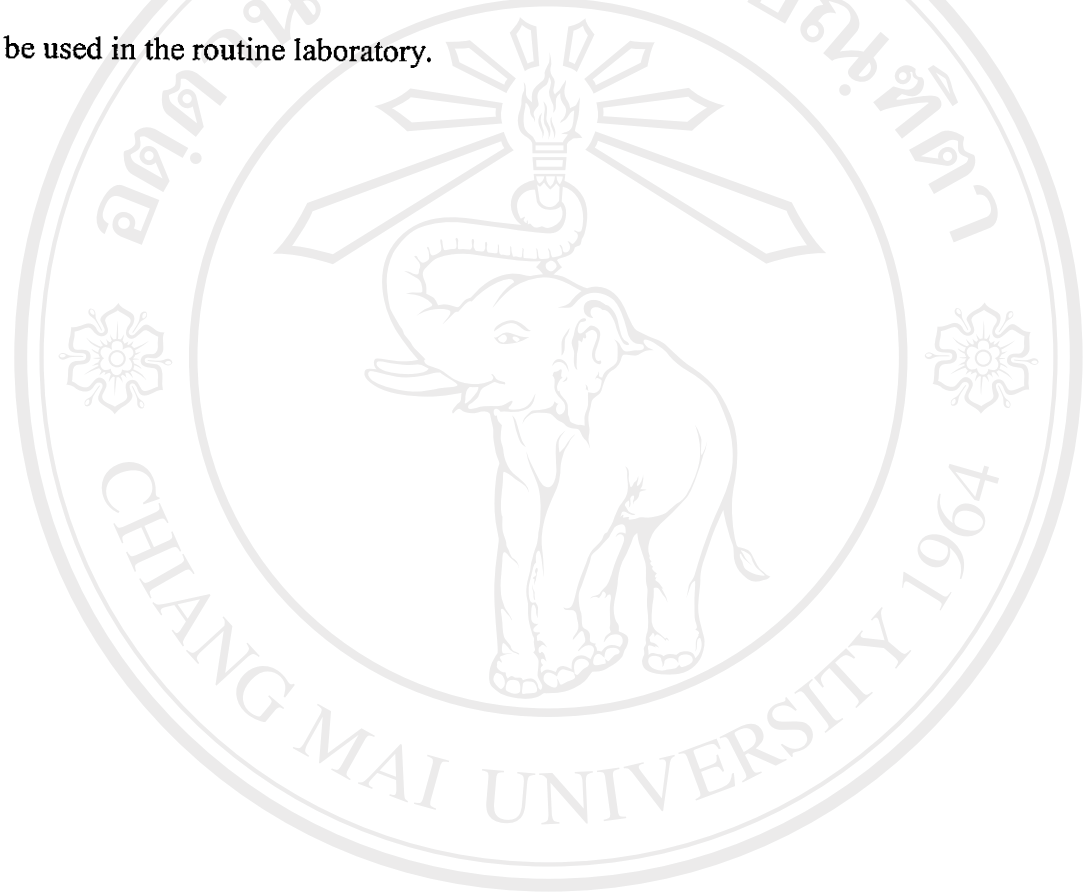
To develop the CD4 lymphocyte enumeration reagents, FITC labeled MT4 mAb and PerCP labeled CD45 mAb were directly stained whole blood sample. MT14/3 mAb together with PE labeled anti-mouse IgG antibody were used to stain the blood sample. All antibodies used were titrated for the optimal concentrations and found that FITC labeled MT4 mAb 40 μg/ml, PerCP labeled anti-CD45 mAb 20 μl and purified MT14/3 100 μg/ml with PE conjugated anti-mouse IgG at dilution 1:8 were the optimal concentrations. To verify the efficiency of the developed reagents, CD4 lymphocytes of 57 blood samples were determined by using the developed reagents and the standard two-color Simultest™ reagents. A very high degree of correlation between both reagents was obtained with correlation coefficient of 0.995 and 0.998 for the percentage and the absolute CD4 lymphocyte count respectively.

In addition, the development of RBC lysing solution was also studied. Several solutions were prepared and compared. It was found that 3% formaldehyde-NH_4Cl and 3% formaldehyde-NH_4Cl-PBS lysing solutions provided appropriate leukocyte cellular distribution pattern. Both reagents were then selected for testing the accuracy by measurement of lymphocyte CD4, CD8 and CD3 subsets in 40 blood samples in comparison with standard FACS™ lysing solution. The developed red blood cell lysing solutions showed a high degree of correlation with the FACS™ lysing solution in both the percentage and the absolute number of all tested lymphocyte subsets.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Correspondingly, the in-house red blood cell lysing solutions could be replaced the commercial FACS™ lysing solution.

In this study, the reagents for enumeration of CD4 lymphocytes and red blood cell lysing solution were developed. These reagents could be used for enumeration of lymphocyte sub-populations with accuracy and inexpensive and should be used in the routine laboratory.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาชุดน้ำยาเพื่อตรวจนับจำนวนลิมโฟไซต์ชนิดซีดี4 ในเลือดด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

ชื่อผู้เขียน นางสาว มาริษา อินจันทร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	กรรมการ
ผศ. ศักดิ์ชัย เดชตรัยรัตน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

การตรวจนับจำนวนลิมโฟไซต์ชนิดซีดี4 สามารถนำมาใช้ในการแบ่งระยะของการติดเชื้อเอชไอวี พยากรณ์ความรุนแรงของโรค เป็นดัชนีบ่งชี้การเริ่มรักษาและประเมินผลการรักษา ปัจจุบันวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจนับจำนวนลิมโฟไซต์ชนิดซีดี4 คือการย้อมเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยแอนติบอดีจำเพาะที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ วิธีนี้ถึงแม้จะให้ค่าที่น่าเชื่อถือ แต่น้ำยาที่ใช้ตรวจต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาแพงมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาน้ำยาตรวจนับลิมโฟไซต์ชนิดซีดี4 ขึ้นมาใช้เองโดยชุดน้ำยานี้ประกอบด้วยแอนติบอดีต่อซีดี4 ที่ติดฉลากด้วยสาร FITC แอนติบอดีต่อซีดี14 แอนติบอดีต่อ IgG ของหนูที่ติดฉลากด้วยสาร PE และแอนติบอดีต่อซีดี45 ที่ติดฉลากด้วยสาร PerCP ในการศึกษานี้เริ่มต้นด้วยการเตรียมแอนติบอดีต่อโปรตีนซีดี4 (MT4) และแอนติบอดีต่อโปรตีนซีดี14 (MT14/3) ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography แล้วนำแอนติบอดี MT4 มาติดฉลากด้วยสาร FITC และทำการทดสอบความจำเพาะของ MT4 และ MT14/3 โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เตรียมได้โดยนำไปย้อมกับเซลล์ชนิด PBMC และ COS เซลล์ที่มีโมเลกุล ซีดี4 หรือซีดี14 อยู่บนผิวเซลล์

เพื่อพัฒนาชุดตรวจนับจำนวนลิมโฟไซต์ชนิดซีดี4 ได้นำ MT4 แอนติบอดีที่ติดฉลากกับสาร FITC และโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อซีดี45 ที่ติดฉลากกับสาร PerCP มาย้อมตัวอย่างเลือดโดยตรง และนำ MT14/3 แอนติบอดีมาย้อมตัวอย่างเลือดร่วมกับแอนติบอดีต่อ IgG ของหนูที่ติดฉลากด้วยสาร PE โดยได้ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ใช้ และพบว่า MT4 แอนติบอดี 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แอนติบอดีต่อซีดี45 20 ไมโครลิตร MT14/3 แอนติบอดี 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแอนติบอดีต่อ IgG ของหนูเจือจาง 8 เท่าจากเริ่มต้นเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นทำการประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาที่พัฒนาขึ้นโดยทำการตรวจนับจำนวนลิมโฟไซต์ชนิดซีดี4 ในตัวอย่างเลือดทั้งหมด 57 รายโดยเปรียบเทียบกับน้ำยามาตรฐานชนิด 2 สี Simultest^{TM} ผลการศึกษาพบว่าค่าลิมโฟไซต์ชนิดซีดี4 ที่ตรวจวัดได้จากน้ำยาทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกันโดยมีค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ สำหรับค่าร้อยละและค่าสมบูรณ์ของลิมโฟไซต์ชนิดซีดี4 เท่ากับ 0.995 และ 0.998 ตามลำดับ

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาน้ำยาสำหรับแตกเม็ดเลือดแดงโดยการเตรียมและเปรียบเทียบสารละลายชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการแตกเม็ดเลือดแดง ผลการศึกษาพบว่าสารละลาย 3%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

formaldehyde-NH_4Cl และ 3% formaldehyde-NH_4Cl-PBS เป็นน้ำยาที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ลักษณะการกระจายของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เหมาะสม จากนั้นจึงนำน้ำยาทั้งสองมาทดสอบความถูกต้องในการตรวจนับลิมโฟไซต์ชนิดซีดี3 ซีดี4 และซีดี8 ในตัวอย่างเลือดทั้งหมด 40 รายโดยเปรียบเทียบกับน้ำยามาตรฐาน FACS^{TM} lysing solution ผลการทดลองพบว่าน้ำยาแตกเม็ดเลือดแดงที่พัฒนาขึ้นและน้ำยา FACS^{TM} lysing solution ให้ผลการตรวจนับจำนวนประชากรกลุ่มย่อยของลิมโฟไซต์ดังกล่าวได้ไม่แตกต่างกัน น้ำยาแตกเม็ดเลือดแดงที่เตรียมขึ้นนี้น่าจะสามารถใช้ทดแทนน้ำยา FACS^{TM} lysing solution ได้

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาน้ำยาตรวจนับจำนวนลิมโฟไซต์ชนิดซีดี4 และน้ำยาสำหรับแตกเม็ดเลือดแดงขึ้นมาใช้เอง น้ำยาที่พัฒนาขึ้นมานี้ให้ผลการตรวจนับจำนวนประชากรกลุ่มย่อยของลิมโฟไซต์ถูกต้องและราคาถูกและน่าจะสามารถนำไปใช้ ในงานประจำวันได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved