IOTest 3
CD25-FITC / CD11c-PE / CD19-ECD

REF A07711
25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

BECKMAN COULTER

IOTest 3
Конъюгированное антитело

IVD CE

РУССКИЙ	Спецификации первого компонента	Спецификации второго компонента	Спецификации третьего компонента
Специфичность	CD25	CD11c	CD19
Клон	B1.49.9	BU15	J3-119
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1/Ag4.1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Аллогенно активированные Т-лимфоциты человека (FC2)	Дендритные клетки синовиальной жидкости	Клетки лимфомы SKLY 18
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, льтивированных in vitro	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, льтивированных in vitro	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, льтивированных in vitro
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	Фикоэритрин R (PE)	Фикоэритрин R-Техасский красный-X (ECD)
Молярная концентрация	5 – 7	0,5 – 1,5	0,5 – 1,5
λ возбуждения	488 нм	488 нм	488 нм
Пик эмиссии	525 нм	575 нм	613 нм
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3		

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD25, CD11c и CD19 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, которые экспрессируются лейкоцитами.

При инкубации образца с реагентом IOTest 3 происходит специфическое окрашивание лейкоцитов. Затем выполняется лизис эритроцитов. Интактные лейкоциты анализируются на проточном цитофлуориметре.

Проточный цитофлуориметр измеряет светорассеивание и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить (гейтировать) интересующую популяцию на диаграмме, отображающей светорассеивание в боковом направлении (Side Scatter или SS) и флуоресценцию ECD, соответствующую окрашенным рецепторам CD19. Для гейтирования популяций можно использовать другие двупараметровые диаграммы в зависимости от используемого приложения. Выделенная таким образом популяция подразделяется на субпопуляции с помощью двух других параметров флуоресценции.

Таким образом положительные окрашенные клетки отличаются от неокрашенных. Результат представляется в виде процентного содержания положительных клеток от всех клеток выбранной популяции.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ экспрессии антигенов CD25, CD11c и CD19 полезен для диагностики волосатоклеточных лейкозов, для которых характерна коэкспрессия этих антигенов (1–5). Несмотря на то, что экспрессия CD11c не является специфической для волосатоклеточных лейкозов, экспрессия CD25 и CD11c при отсутствии экспрессии CD23 и CD5, может служить подтверждением диагноза (1, 6). Подобный дополнительный анализ может быть выполнен с помощью следующего реагента IOTest 3: CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD (каталожный номер A07710).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

До и после распечатки флакона жидкие конъюгаты антител необходимо хранить при температуре 2–8°C в защищенном от света месте.

Стабильность реагента в нераспечатанном флаконе: см. срок годности, указанный на этикетке флакона.

Стабильность реагента в распечатанном флаконе: 90 дней.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

1. Не используйте реагент с истекшим сроком годности.
2. Не замораживайте.
3. Перед использованием реагента необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной (18–25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте контаминации реагента микроорганизмами, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не проглатывайте, избегайте любого контакта с кожей, слизистыми оболочками и глазами.

В кислой среде азид натрия образует азотисто-водородную кислоту, являющуюся потенциально опасным соединением. При утилизации реагента перед сливом в водопроводно-канализационную систему рекомендуется развести реагент большим объемом воды. Это позволит избежать накопления азида натрия в металлических трубах и предотвратить образование взрывчатых веществ.

7. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные. При работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности (в частности, использовать защитные перчатки, халат и очки).
8. Никогда не отбирайте образец через пипетку ртом. Избегайте контакта образца с кожей, слизистыми оболочками и глазами.
9. После завершения работы пробирки с кровью и все одноразовые материалы необходимо поместить в специальные контейнеры для утилизации.

ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

Образцы должны храниться при комнатной температуре (18–25°C). Встряхивание образцов не допускается. Перед отбором аликвоты образец следует гомогенизировать, аккуратно перемешав.

Анализ образцов необходимо выполнить в течение 24 часов после отбора.

МЕТОДИКА

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Пробирки и материалы для отбора проб.
- Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками объемом 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные частицы: флуоросферы Flow-Set (каталожный номер 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Реагент для лизиса эритроцитов IOTest 3 Lysis Solution (каталожный номер A07799).
  - Реагент для фиксации: IOTest 3 Fixative Solution (каталожный номер A07800).
  - Один из следующих негативных контролей IOTest 3:
    Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD19-ECD (каталожный номер A07730) или Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (каталожный номер A07732).
- Буфер (PBS: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Перемешивающее устройство (вортекс).
- Проточный цитофлуориметр.

ПОДГОТОВКА ПРОБ

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07730 или A07732).

1. В каждую из пробирок для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител IOTest 3, а в каждую из пробирок для анализа контролей — по 20 мкл негативного контроля.
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл исследуемого образца крови с ЭДТА (или приблизительно 5×10^5 клеток). Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируйте в течение 15–20 минут при комнатной температуре (18–25°C) в защищенном от света месте.
4. Если требуется, выполните лизис эритроцитов, добавив 2 мл раствора IOTest 3 Lysis Solution (каталожный номер. A07799) в рабочей концентрации (1X). Немедленно перемешайте на вортексе. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Если образец не содержит эритроцитов, добавьте 2 мл PBS.
5. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при $300 \times g$ при комнатной температуре.
6. Удалите супернатант аспирацией.

7. Ресуспендируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.
9. Удалите супернатант аспирацией и ресуспендируйте клетки:

– в 0,5 мл или 1 мл раствора IOTest 3 Fixative Solution (каталожный номер A07800) в рабочей концентрации (1X), если подготовленная проба будет храниться от 2 до 24 часов;
– в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

ЗАМЕЧАНИЕ. Независимо от способа подготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2−8°C в защищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD25, носящая название Tac-антиген, представляет собой α-цепь рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2Rα), трансмембранный гликопротеин с молекулярным весом 55 кДа (7). Высокоаффинный рецептор к ИЛ-2 состоит из трех цепей: α (IL-2Rα, Tac, p55 или CD25), β (IL-2Rβ, p75 или CD122) и γ (IL-2Rγ, p64 или CD132). Антиген CD25 экспрессируется на циркулирующих $CD4^+$ Т-лимфоцитах и не обнаруживается на циркулирующих $CD8^+$ лимфоцитах (8). Однако при активации все Т-лимфоциты экспрессируют CD25. Субпопуляция В-лимфоцитов ($CD20^+$) экспрессирует антиген CD25. Циркулирующие в крови гранулоциты, моноциты, естественные клетки-киллеры, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют CD25 (7).

На второй Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (2nd HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1984 г., было подтверждено, что моноклональные антитела B1.49.9 направлены против CD25 (Code WS: T141, Section T) (9).

Антиген CD11c (αX-субъединица интегрина/ поверхностный антиген p150) представляет собой трансмембранный протеин I типа, который экспрессируется в основном моноцитами, макрофагами и NK-клетками, и в меньшей степени гранулоцитами, дендритными клетками и некоторыми субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов (10).

На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела BU15 направлены против CD11c (WS Code: 256, Section M) (11).

Молекула CD19 экспрессируется на поверхности всех В-клеток, от ранних пре-В-клеток до зрелых В-лимфоцитов. Утрата экспрессии CD19 происходит при дифференцировке В-лимфоцитов в плазмоциты (12−14). Экспрессия CD19 не наблюдается на Т-лимфоцитах, NK-клетках, моноцитах или гранулоцитах (14).

На четвертой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (4th HLDA Workshop), проходившей в Вене, Австрия, в 1989 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J3-119 направлены против CD19 (15, 16).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии и клетки отрицательной линии. Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение клеток положительной и отрицательной линий изменялось от 0 до 100%.

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

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD25	Y = 0,96 X + 1,83	0,999
CD11c	Y = 0,99 X + 0,13	0,998
CD19	Y = 0,99 X + 0,91	0,997

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 было проведено исследование образцов цельной крови 50 здоровых взрослых людей с использованием выше описанного реагента. В следующих таблицах представлены результаты подсчета субпопуляций лейкоцитов у этих 50 доноров:

Лимфоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
$CD25^+$	50	8,78	3,76	43
$CD11c^+$	50	20,54	6,51	32
$CD19^+$	50	9,20	4,26	46

Моноциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
$CD11c^+$	50	95,04	2,68	3

Гранулоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
$CD11c^+$	50	98,76	1,81	2

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевых популяций, которые экспрессируют эти маркеры (линия клеток FEV20.3 для CD25 и лимфоциты для CD11c и CD19). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Линия клеток FEV20.3	Кол-во измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
$CD25^+$	12	24,32	0,65	2,7

Лимфоциты	Кол-во измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
$CD11c^+$	12	13,18	0,22	1,7
$CD19^+$	12	8,52	0,22	2,6

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.
3. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и следовать нормативам надлежащей лабораторной практики (GLP).
4. Конъюгаты антител данного реагента откалиброваны для получения наилучшего соотношения специфического и неспецифического сигнала. Поэтому в каждом исследовании необходимо строго соблюдать соотношение между объемом реагента и объемом образца.
5. При гиперлейкоцитозе образец следует развести в PBS до концентрации примерно 5×10^9 лейкоцитов/л.
6. При некоторых заболеваниях, таких как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатия, лизис эритроцитов может происходить медленно, не полностью или совсем не происходить. В этом случае перед окрашиванием рекомендуется выделить мононуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фиколла).
7. В связи с тандемной структурой флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик эмиссии различен в разных сериях ECD. Поэтому для целей многоцветного анализа компенсационную матрицу следует тщательно контролировать при смене серии ECD-конъюгата.

РАЗНОЕ

Примеры (Examples) и ссылки (References) смотрите в Приложении (Appendix).

ТОРГОВЫЕ МАРКИ

Логотип Beckman Coulter, ECD, Flow-Set, IOTest, являются товарными знаками Beckman Coulter; логотип Beckman Coulter, IOTest и VersaLyse зарегистрированы в USPTO и SIPO.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

ИЗГОТОВИТЕЛЬ :

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
Франция
Отдел обслуживания клиентов: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Made in France.

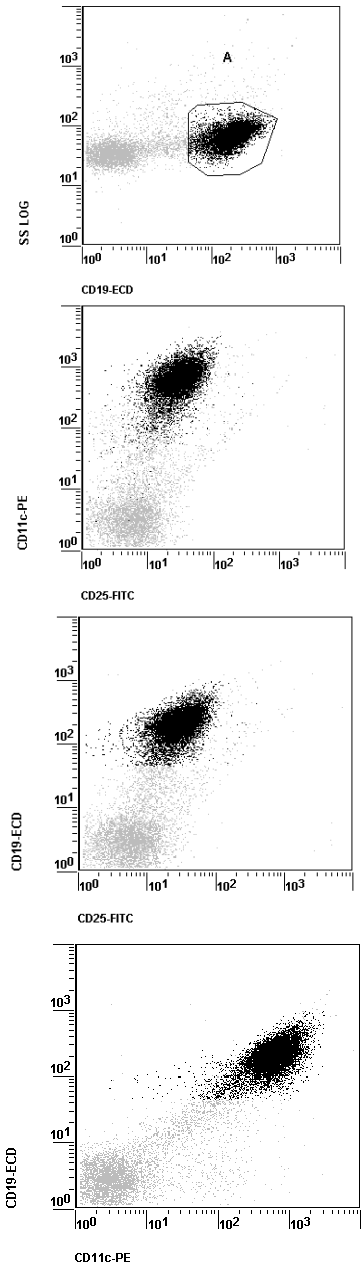
© 2011 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

APPENDIX TO REF A07711

EXAMPLES

The 4 diagrams below are biparametric representations (Side Scatter versus Fluorescence Intensity or Fluorescence Intensity versus Fluorescence Intensity) of a Hairy Cell Leukemia specimen (HCL, Peripheral blood). Staining is with the IOTest 3 CD25-FITC / CD11c-PE / CD19-ECD Conjugated Antibodies (Ref. A07711). Lysis and fixation are with IOTest 3 Lysing Solution (Ref. A07799) and IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) respectively. All events acquired are shown. Region A defines the gating strategy (CD19-positive blast cluster) used on this example. Gated events are shown in dark in all histograms.

Acquisition is with a COULTER EPICS XL flow cytometer equipped with System II Software. Analysis is with EXPO Cytometer Software (Ref. 6605434).



REFERENCES

1. Rothe, G., Schmitz, G., Adorf, D., Barlage, S., Gramatzki, M., Hffkes, H.G., Janossy, G., Knüchel, R., Ludwig, W.D., Nebe, T, Nerl, C., Orfao, A., Serke, S., Sonnen, R., Tichelli, A., Wrmann, B., "Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies", 1996, Leukemia, 10, 877-895.
2. Borowitz, M.J., Bray, R., Gascoyne, R., Melnick, S., Parker, J.W., Picker, L., Stetler-Stevenson, M., "U.S. Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Data analysis and interpretation", 1997, Cytometry, 30, 236-244.
3. Burns, A.R., Simon, S.I., Kukielka, G.L., Rowen, J.L., Lu, H., Mendoza, L.H., Brown, E.S., Entman, M.L., Smith, C.W., "Chemotactic factors stimulate CD18 dependent canine neutrophil adherence and motility on lung fibroblasts", 1996, J. Immunol., 156, 3389-3401.
4. Rothe, G., Schmitz, G. Adorf, D., Barlage, S., Gramatzki, M., Hanenberg,H., Hffkes H.G., Janossy, G., Knüchel, R., Ludwig, W.D., Nebe, T., Nerl, C., Orfao, A., Serke, S., Sonnen, R., Tichelli, A., Wrmann, B., "Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies", 1996, Leukemia, 10, 877-895.
5. Stewart, C.C., Behm, F.G., Carey, J.L., Cornbleet, J., Duque, R.E., Hudnall, S.D., Hurtubise, P.E., Loken, M., Tubbs, R.R., Wormsley, S., "U.S. Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Selection of antibody combinations", 1997, Cytometry, 30, 231-235.
6. Jenning, C.D., Foon, K.A., "Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy", 1997, Blood, 90, 2863-2892.
7. Sasaki, Y., Sugamura, K., "CD25 Workshop panel report", 1997, Leucocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens. Kishimoto, T., et al, Eds., Garland Publishing, Inc., 802-804.
8. Kaplan, D., "Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines", 1996, Immunol. Today, 17, 303-304.
9. Haynes, B.F., "Summary of T cell studies performed during the second International Workshop and Conference on Human Leukocytes Differentiation Antigens", 1986, Leucocyte Typing II, Human T lymphocytes, Reinherz, E.L., et al. Eds., Springer-Verlag, 3-30.
10. Luk, J., Springer, T.A., "CD11c cluster report", 1995, Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens. Schlossman, S.F., et al., Eds., Oxford University Press, 1590-1592.
11. Cobbold, S., Hale, G., Waldmann, H., "Non-lineage, LFA-1 family, and leukocyte common antigens: New and previously defined clusters", 1987, Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens, McMichael A.J., et al., Eds., Oxford University Press, 788-803.
12. Uckun, F.M., "Regulation of human B-cell ontogeny", 1990, Blood,10, 76, 1908-1923.
13. Loken, M.R., Shah, V.O., Dattilio, K.L., Civin, C.I., "Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development", 1987, Blood, 70, 1316-1324.
14. Pesando, J. M., Bouchard, L. S., McMaster, B. E., “CD19 is functionally and physically associated with surface immunoglobulin”, 1989, J. Exp. Med., 170, 2159-2164.
15. “CD Guide “ Compiled by the organizing committee, 1989, Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 1078.
16. “Listing of all Fourth Workshop antibodies“, 1989, Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 1094-1110.