

**IOTest 3
CD16-FITC
CD56-PE
CD3-ECD**

REF A07728

25 определений; 0,5 мл
20 мкл / определение



**IOTest 3
Конъюгированное антитело**



РУССКИЙ

	Спецификации первого компонента	Спецификации второго компонента	Спецификации третьего компонента
Специфичность	CD16	CD56	CD3
Клон	3G8	N901 (NKH-1)	UCHT1
Гибридома	SP2/0 x Balb/c	NS1/1-Ag4 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Нейтрофилы человека	Клетки хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) человека	T-клетки линии + IL2
Иммуноглобули	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, литьевых in vitro	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, литьевых in vitro	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, литьевых in vitro
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	Фикоэритрин R (PE)	Фикоэритрин R – Техасский красный-X (ECD)
Молярная концентрация	3.5 – 7.5	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 многопараметрического анализа лейкоцитов с помощью проточной цитометрии. Она позволяет обнаружить экспрессию на лейкоцитах антигенов CD16, CD56 и CD3.

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 анализирует светорассеивание и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить (гейтировать) интересующую популяцию на двухпараметрической гистограмме, отображающей светорассеивание в боковом направлении (Side Scatter или SS) и флуоресценцию ECD, соответствующую экспрессии CD3. Гейтированная таким образом популяция клеток далее подразделяется на субпопуляции при помощи двух других параметров флуоресценции. Для гейтирования популяций также можно использовать другие двухпараметровые гистограммы.

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

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Антиген CD16 является низкоаффинным рецептором для иммуноглобулина G (IgG) (FcγRIII), который экспрессируется на NK-клетках (натуральных киллерах), моноцитах, макрофагах и нейтрофилах (1, 2).

Антиген CD56 экспрессируется на NK-клетках (3, 4) и на субпопуляции CD3+ T-клеток (5). Он не экспрессируется моноцитами, гранулоцитами, эритроцитами и B-лимфоцитами.

Данный реагент IOTest 3 полезен при дифференциальной диагностике T-клеточного варианта лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов (CD16+ CD56- CD3+) и NK-клеточного варианта (CD16+ CD56+ CD3-) (6-9). Чтобы подтвердить T-клеточное или NK-клеточное происхождение этих лейкозов, фенотипирование можно проводить с использованием реагента IOTest 3 CD8-FITC/CD4-PE/CD3-ECD (каталожный номер A07726). T-клетки лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов имеют фенотип CD3+, CD4- и CD8+, тогда как NK-клетки этого типа

новообразования имеют фенотип CD3-, CD4- и иногда CD8+.

ХРАНЕНИЕ 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 нераспечатанном флаконе: 90 дней.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

1. Не используйте реагент системным 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 (NaN₃), 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 азидов 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 непоставляемые 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 лейкоцитов IOTest 3 Fixative Solution (каталожный номер A07800).
 - Один из следующих отрицательных контролей IOTest 3:
 - Neg. Ctrl.-FITC / Neg. Ctrl.-PE / CD3-ECD (каталожный номер A07731) 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 отрицательным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07731 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 отрицательного контроля.
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл образца. Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируйте в течение 15-20 минут при комнатной температуре (18-25°C) в защищенном от света месте.
4. Если требуется, выполните лизис эритроцитов, добавив 2 мл раствора для лизиса эритроцитов 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 x g при комнатной температуре.
6. Удалите супернатант аспирацией.
7. Ресуспандируйте 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 для фиксации 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 прободготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C в защищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

На четвертой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (4th HLDA Workshop), проходившей в Вене, Австрия, в 1989 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 3G8 направлены против CD16 (WS Code: 409, Section NL) (10).

На четвертой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (4th HLDA Workshop), проходившей в Вене, Австрия, в 1989 г., было подтверждено, что моноклональные антитела N901 (NKH-1) направлены против CD56 (WS Code: 9, Section NL) (11).

Моноклональные антитела UCHT1 окрашивают β цепь комплекса CD3 (12). На первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г., было подтверждено, что моноклональные антитела UCHT1 направлены против CD3 (WS Code: 3, Section T) (13).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания CD16 этим реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки периферической крови (CD16⁺ гранулоциты) и CD16⁻ (HPBALL) клетки. Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Для проверки линейности окрашивания CD56 и CD3 этим реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки линии MO7E (CD56⁺ CD3⁻) и клетки линии PHBALL (CD56⁻ CD3⁺). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии с описанной выше методикой. На основании полученных и

ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R ²)
CD16	Y = 1,001 X – 0,56	0,999
CD56	Y = 0,955 X + 1,36	0,999
CD3	Y = 0,980 X + 1,50	0,999

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 описанного выше реагента. В следующих таблицах представлены результаты подсчета субпопуляций лейкоцитов у этих 50 человек:

Лимфоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD16 ⁺	50	13,2	7,2	54
CD56 ⁺	50	17,7	7,2	41
CD3 ⁺	50	72,7	7,1	10

Моноциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD16 ⁺	50	75,4	16,4	22

Гранулоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD16 ⁺	50	87,4	12,1	14

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание окрашенных клеток на реагенте IMMUNO-TROL Control Cells (каталожный номер 6607077). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующих таблицах:

Лимфоциты	Кол-во измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD3 ⁺	12	71,3	0,5	0,6
CD16 ⁺	12	16,3	0,46	2,8

Гранулоциты	Кол-во измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD16 ⁺	12	96,1	0,23	0,2

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном расположении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры 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 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, фикола).
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, и VersaLyse 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 A07728

REFERENCES

1. Ravetch, J.V., Perussia, B., "Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils", 1989, *J. Exp. Med.*, 170, 481-497.
2. Huizinga, T.W.J., Roos, D., von dem Borne, A.E.G. Kr., "Neutrophil Fc γ receptors: A two-way bridge in the immune system", 1990, *Blood*, 75, 1211-1214.
3. Griffin, J.D., Hercend, T., Beveridge, R., Schlossman, S.F., "Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells", 1983, *J. Immunol.*, 130, 2947-2951.
4. Hercend, T., Griffin, J.D., Bensussan, A., Schmidt, R.E., Edson, M.A., Brennan, A., Murray, C., Daley, J.F., Schlossman, S.F., Ritz, J., "Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone: Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes", 1985, *J. Clin. Invest.*, 75, 932-943.
5. Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., Phillips, J.H., "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes", 1986, *J. Immunol.*, 136, 4480-4486.
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. Orfao, A., Ruiz-Arguelles, A., Lacombe, F., Ault, K., Basso, G., Danova, M., "Flow Cytometry: Its applications in hematology", 1995, *Haematologica*, 80, 69-81.
8. Rosenberg, S.A., "Classification of lymphoid neoplasms", 1994, *Blood*, 84, 1359-1360.
9. 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.
10. Schmidt, R.E., Perussia, B., "Cluster report: CD16", 1989, *Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 574-578.
11. Schubert, J., Lanier, L.L., Schmidt, R.E., "Cluster report: CD56", 1989, *Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 699-702.
12. Tunnacliffe, A., Olsson, C., Traunecker, A., Krissansen, G.W., Karjalainen, K., De la Hera, A., "The majority of CD3 epitopes are conferred by the ϵ chain", 1989, *Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 295-296.
13. Van Aghoven, A., Terhorst, C., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F., "Characterization of T cell surface glycoproteins T1 and T3 present on all human peripheral T lymphocytes and functional mature T lymphocytes", 1981, *Eur. J. Immunol.*, 11, 18-21.