

**IOtest 3  
CD38-FITC  
CD56-PE  
CD45-ECD**

**REF A07714**

25 определений; 0,5 мл  
20 мкл / определение



**IOtest  
Конъюгированное антитело**



РУССКИЙ	Спецификации первого компонента	Спецификации второго компонента	Спецификации третьего компонента
<b>Специфичность</b>	CD38	CD56	CD45
<b>Клон</b>	T16	N901 (NKH-1)	J33
<b>Гибридома</b>	SP2/0 x Balb/c	NS1/1-Ag4 x Balb/c	NS1 x Balb/c
<b>Иммуноген</b>	Лимфоциты периферической крови, активированные фитогемагглютинином (ФГА)	Клетки хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) человека	Клетки линии Laz 221
<b>Иммуноглобулин</b>	IgG1	IgG1	IgG1
<b>Вид</b>	Мышь	Мышь	Мышь
<b>Источник</b>	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, лывивированных in vitro	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, лывивированных in vitro	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, лывивированных in vitro
<b>Очистка</b>	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
<b>Флуорохром</b>	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	R Фикоэритрин (PE)	R Фикоэритрин -Техасский красный®-X (ECD)
<b>Молярная концентрация</b>	4 – 7	0,5 – 1,5	0,5 – 1,5
<b>λ возбуждения</b>	488 nm	488 nm	488 nm
<b>Пик эмиссии</b>	525 nm	575 nm	613 nm
<b>Буфер</b>	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN <sub>3</sub>		

**НАЗНАЧЕНИЕ**

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для многопараметрического анализа лейкоцитов с помощью проточной цитометрии. Она позволяет обнаружить экспрессию на лейкоцитах антигенов CD38, CD56 и CD45.

**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 CD45. 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**

Анализ экспрессии антигена CD45 полезен при фенотипировании лейкозов, поскольку позволяет гейтировать бластные клетки на гистограмме, отображающей боковое светорассеивание (Side Scatter) анализируемых клеток и флуоресценцию CD45. Бластные клетки обычно экспрессируют CD45 в меньшей степени по сравнению с нормальными клетками (1).

Данный реагент IOtest 3 позволяет отличить нормальные плазматические клетки от

опухолевых в костном мозге (при лейкозе или множественной миеломе, ММ).

При ММ для плазматических клеток характерна выраженная экспрессия CD38, экспрессия CD56, отсутствие экспрессии В-клеточных поверхностных маркеров (CD19, CD20, CD22 и Ig), а также отсутствие или низкий уровень экспрессии CD45 (1–5).

Лейкозные плазматические клетки отличаются от плазматических клеток при ММ отсутствием экспрессии CD56 (5). Тем не менее, для некоторых типов ММ может быть характерно отсутствие экспрессии CD56 (5).

**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.

**СОСТАВ РЕАГЕНТА**

Чтобы узнать концентрацию антител в данном реагенте IOtest 3, свяжитесь с вашим представителем компании Beckman Coulter.

**ПРИЗНАКИ НЕПРИГОДНОСТИ РЕАГЕНТА**

Если упаковка реагента повреждена или если вы получили результаты, свидетельствующие об ухудшении качества реагента, свяжитесь с вашим представителем компании Beckman Coulter или отправьте письмо по адресу: immuno-techsup@beckmancoulter.com

**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<sub>3</sub>), требуют осторожного обращения. Не

проглатывайте, избегайте любого контакта с кожей, слизистыми оболочками и глазами.

В кислой среде азид натрия образует азотистую-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 необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта.

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 отрицательных контролей IOTest 3:  
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (каталожный номер A07729) или Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (каталожный номер A07732).
- Буфер (PBS: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М 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 A07729 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 соответствующего негативного 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 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. 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 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

На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3<sup>rd</sup> HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела T16 направлены против CD38 (WS Code: 915 Section B) (6).

На четвертой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (4<sup>th</sup> HLDA Workshop), проходившей в Вене, Австрия, в 1989 г., было подтверждено, что моноклональные антитела N901 (NKH-1) направлены против CD56 (WS Code: NK59, Section NK) (7).

Моноклональные антитела J33 окрашивают все изоформы молекулы CD45, поэтому данные антитела считаются панлейкоцитарным маркером. На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3<sup>rd</sup> HLDA Workshop), проходившей в

Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) (8).

### ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии MO7E (CD38<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>) и клетки отрицательной линии FRN14.33 (CD38<sup>-</sup> CD56<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>). 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 <sup>2</sup> )
CD38	Y = 0,973 X + 3,25	0,999
CD56	Y = 0,969 X + 1,37	0,999
CD45	Y = 0,962 X + 1,59	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 вышеописанного реагента. В следующих таблицах представлены результаты подсчета субпопуляций лейкоцитов у этих 50 человек:

Лимфоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD38 <sup>+</sup>	50	33,5	11,8	35
CD56 <sup>+</sup>	50	14,6	6,8	47

Моноциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD38 <sup>+</sup>	50	94,2	4,3	5

Гранулоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD38 <sup>+</sup>	50	99,3	0,9	1

### ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание окрашенных клеток положительной линии (MO7E). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Клетки линии MO7E	Кол-во измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD38	12	100	0	0
CD56	12	99,8	0,03	0,03
CD45	12	97,8	0,12	0,1

### 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  $5 \times 10^9$  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 моноуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фиколла).
7. Описаны случаи остро лимфобластного лейкоза с отсутствием окрашивания по CD45 или с очень слабым окрашиванием. В таких случаях принадлежность blastов к лимфоидному ряду следует подтверждать с помощью других маркеров.
8. По причине тандемной структуры данного флуорохрома, ECD также испускает излучение при 575 нм. Наличие и величина второго пика эмиссии варьирует у разных лотов конъюгата антител с ECD. Поэтому для выполнения многоцветного анализа необходимо тщательно отрегулировать величины компенсации в компенсационной матрице при смене лота конъюгатов ECD

### 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 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 A07714

### EXAMPLES

The diagrams below are biparametric representations (Side Scatter versus Fluorescence Intensity or Fluorescence Intensity versus Fluorescence Intensity) of a bone marrow aspirate with Plasma Cells Dyscrasia. Staining is with IOTest 3 Conjugated Antibodies (Ref. A07714). Lysis and fixation are with IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799) and IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) respectively.

Acquisition is performed with a COULTER EPICS XL flow cytometer equipped with System II software and analysis is with EXPO Cytometer software (Ref. 6605434).

All events acquired are shown in Figure 1. Region A (CD38<sup>bright</sup>, black color) and B (CD38<sup>dim</sup>, grey color) define the gating strategy used on this example. Figures 2, 3 and 4 display only A + B gated events. The blasts (CD38<sup>bright</sup>CD56<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>) are shown in dark on Figures 2, 3, and 4.

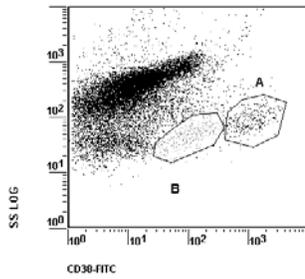


Figure 1

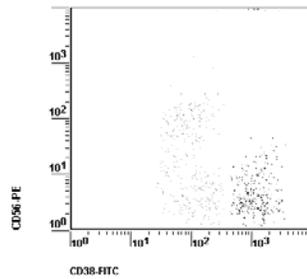
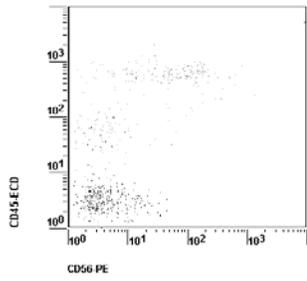
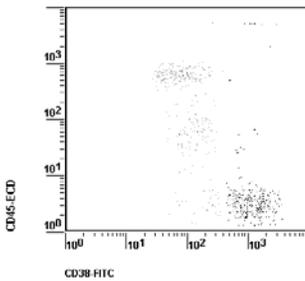


Figure 2



### REFERENCES

- Jenning, C.D., Foon, K.A., "Recent advances in flow cytometry : application to the diagnosis of hematologic malignancy", 1997, *Blood*, 90, 2863-2892.
- 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.
- Rosenberg, S.A., "Classification of lymphoid neoplasms", 1994, *Blood*, 84, 1359-1360.
- 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.
- Pellat-Deceunynck, C., Barillé, S., Jego, G., Puthier, D., Robillard, N., Pineau, D., Rapp, M.-J., Harousseau, J.-L., Amiot, M., Bataille, R., "The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma", 1998, *Leukemia*, 12, 1977-1982.
- Ling, N.R., MacLennan, I.C.M., Mason, D.Y., "B-cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters", 1987, *Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens*, McMichael A.J., et al., Eds., Oxford University Press, 302-335.
- 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.
- Cobbold, S., Hale, G., Waldmann, H., "Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte 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.