

IOTest 3
CD19-FITC /
CD10-PE /
CD45-ECD

REF A07713

25 определений; 0,5 мл
 20 мкл / определение



IOTest 3
Конъюгированное
антитело

IVD



РУССКИЙ

	Спецификации первого компонента	Спецификации второго компонента	Спецификации третьего компонента
Специфичность	CD19	CD10	CD45
Клон	J3-119	ALB1	J33
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Клетки лимфомы SKLY18	Клетки лейкоза человека	Клеточная линия LAL Laz 221
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, лътивированных in vitro	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, лътивированных in vitro	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, лътивированных in vitro
Очистка	Аффинная хроматография	Ионообменная хроматография или аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Флуоресцеин изотиоцианат (FITC)	Фикоэритрин R (PE)	Фикоэритрин-Texas Red-X (ECD)
Молярная концентрация	4.5 – 7.5	0.5 – 1.5	0.5 – 1.5
λ возбуждения	488 nm	488 nm	488 nm
Пик эмиссии	525 nm	575 nm	613 nm
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 CD19, CD10 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 популяции также можно использовать другие двухпараметровые гистограммы.

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

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ экспрессии антигена CD45 полезен при фенотипировании лейкозов, поскольку позволяет выявить бластные клетки на гистограмме, отображающей боковое светорассеивание (Side Scatter) анализируемых клеток и флуоресценцию ECD (CD45) (1, 2). Экспрессия антигена CD45 умеренна и даже отсутствует при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) из ранних В-клеток-предшественников, пре-В-клеточных вариантах ОЛЛ и на незрелых В-клетках костного мозга. В-клеточные ОЛЛ можно разделить на 2 подгруппы: В-ОЛЛ CD10⁺ и В-ОЛЛ CD10⁻ при этом первая группа характеризуется более благоприятным прогнозом (3). Примерно 60% ОЛЛ у детей характеризуются транслокацией 11q23 и имеют фенотип CD10⁻ (лейкоз из В-клеток-предшественников и пре-В-клеток) (3). Наконец, по разнице в экспрессии маркера CD20 можно дифференцировать гематогонны (предшественники нормальных В-клеток, CD19⁺CD10⁺), которые обнаруживаются после химиотерапии или после трансплантации костного

мозга, от остаточных клеток В-ОЛЛ (которые также имеют фенотип CD19⁺CD10⁺). В этом случае следует использовать комбинацию антител IOTest 3 CD20-FITC / CD10-PE / CD19-ECD (каталожный номер A07708) (3).

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 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 (NaN₃), требуют осторожного обращения. Не проглатывайте, избегайте любого контакта с кожей, слизистыми оболочками и глазами. В кислой среде азид натрия образует азотистоводородную кислоту, являющуюся потенциально опасным соединением. При утилизации реагента перед сливом в водопроводно-канализационную систему рекомендуется развести реагент большим объемом воды. Это позволит избежать накопления азидата натрия в металлических трубах и предотвратить образование взрывчатых веществ.
7. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные; при работе с данными образцами 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 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 цитометр.

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. Во все пробирки добавьте по 100 мкл исследуемого образца (или объема, эквивалентного приблизительно 5 x 10⁵ клеток). Аккуратно перемешайте пробирку 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

вortexe в течение 1 секунды. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Если образец не содержит эритроцитов, добавьте 2 мл PBS.

- Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
- Удалите супернатант аспирацией.
- Ресуспандируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
- Повторите шаг 5.
- Удалите супернатант аспирацией и ресуспандируйте 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 прободготовки, готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C в защищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD19 экспрессируется на поверхности всех В-лимфоцитов, от ранних пре-В-клеток до зрелых В-лимфоцитов. В-лимфоцит теряет экспрессию CD19 на стадии дифференцировки в плазмочит (4-6). Молекула CD19 не экспрессируется Т-лимфоцитами, NK-клетками, моноцитами и гранулоцитами (6).

На четвертой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (4th HLDA Workshop), проходившей в Вене, Австрия в 1989 году, было подтверждено, что моноклональные антитела J3-119 направлены против CD19 (7, 8).

Молекула CD10 представляет собой трансмембранный гликопротеин II типа с молекулярной массой 100 кДа (9–11). Изначально, молекула CD10, именуемая также CALLA (Общий антиген ОЛЛ), была описана как антиген, специфический для большинства злокачественных гематологических заболеваний (12). В последующих исследованиях было показано, что антиген CD10 также может экспрессироваться у здоровых людей, на поверхности лимфоидных клеток-предшественников, а также на поверхности клеток некоторых других гемопоэтических линий (зрелых нейтрофилов) и даже на поверхности клеток других тканей (почечного эпителия, фибробластов) (10).

Антиген CD10 экспрессируется на ранних стадиях дифференцировки на лимфоидных клетках-предшественниках, которые еще не коммитированы в направлении В- или Т-клеточных линий. В-клетки теряют экспрессию CD10 с появлением поверхностных иммуноглобулинов; она снова обнаруживается на активированных В-клетках или на стадии пролиферации (9–11). Коммитирование лимфоидных клеток-предшественников в направлении Т-клеточной дифференцировки сопровождается потерей экспрессии CD10 (9-11). Моноклональные антитела ALB1 специфически распознают молекулу CD10 (12).

Понятие «молекулы CD45» включает ряд изоформных молекул, которые распознаются с помощью, как минимум, 4-х групп специфических антител: CD45RA, CD45RB, CD45RC и CD45R0. Эти изоформы образуются путем альтернативного сплайсинга трех экзонов одного гена, кодирующего пептиды А, В и С молекулы CD45 (13). Семейство гликопротеинов CD45, экспрессируемое на поверхности лейкоцитов

человека, отсутствует на поверхности эритроцитов (14). Плотность экспрессии антигена CD45 на лимфоцитах больше, чем на моноцитах, а на моноцитах, в свою очередь, больше, чем на поверхности нейтрофилов (15).

Моноклональные антитела J33 взаимодействуют со всеми изоформами CD45 (с молекулярным весом от 180 до 220 кДа), и поэтому считаются панлейкоцитарным маркером. На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Великобритания, в 1986 было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) (16).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки линии RAMOS (CD19⁺ CD10⁺ CD45⁺) и клетки линии FRN14.33 (CD19⁻ CD10⁻ CD45⁻). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение RAMOS / FRN14.33 в смеси 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)
CD19	Y = 0,94 X + 2,07	99,97
CD10	Y = 0,98 X + 1,19	99,96
CD45	Y = 0,98 X + 0,94	99,96

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 людей с использованием выше описанного реагента. В следующей таблице представлены средние значения для интересующих субпопуляций лейкоцитов:

Лимфоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD19 ⁺	50	9,50	4,30	45
CD10 ⁺	50	1,12	0,75	67
CD45 ⁺	50	94,63	3,77	4

Моноциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD10 ⁺	50	3,14	2,07	66
CD45 ⁺	50	96,31	2,91	3

Гранулоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD10 ⁺	50	94,53	9,58	10
CD45 ⁺	50	99,62	0,53	1

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре в одном образце определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевой популяции, которые экспрессируют эти три маркера (клеточная линия RAMOS). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Клеточная линия	Кол-во измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
RAMOS				
CD19 ⁺	12	99,99	0,03	0,03
CD10 ⁺	12	99,98	0,04	0,04
CD45 ⁺	12	99,99	0,03	0,03

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном расположении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
- Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.
- Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и следовать нормативам надлежащей лабораторной практики (GLP).
- 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.
- При гиперлейкоцитозе образец следует развести PBS до концентрации примерно 5×10^9 лейкоцитов/л.
- 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).
- Описаны случаи острого лимфобластного лейкоза с отсутствием окрашивания по CD45 или с очень слабым окрашиванием. В таких случаях принадлежность бластов к лимфоидному ряду следует подтверждать с помощью других маркеров.
- 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, EPICS, EXPO, Flow-Set, IOTest, System II, XL, 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.



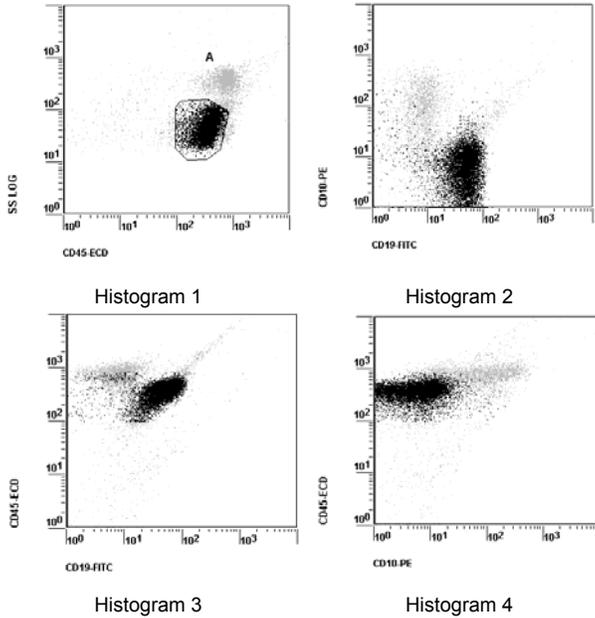
APPENDIX TO REF A07713

EXAMPLES

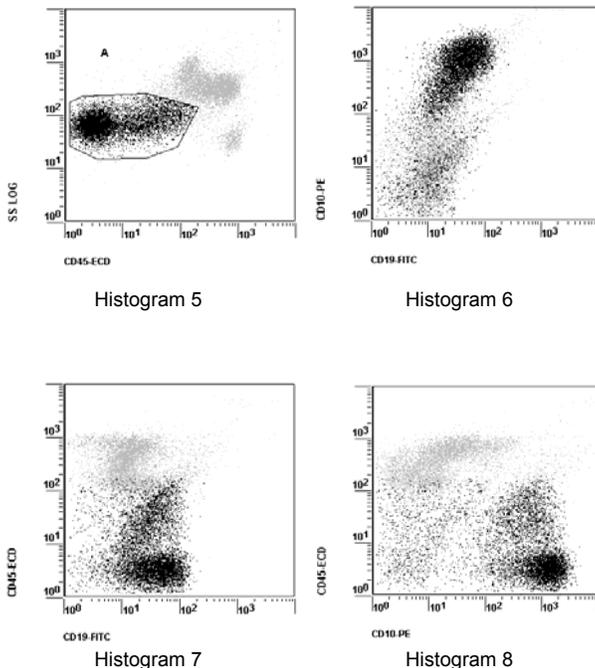
The 8 diagrams below are biparametric representations (Side Scatter versus Fluorescence Intensity or Fluorescence Intensity versus Fluorescence Intensity) of two specimens stained with IOTest 3 CD19-FITC / CD10-PE / CD45-ECD Conjugated Antibodies (Ref. A07713). Red blood cell lysis and leucocyte fixation are with the IOTest 3 Lysing Solution (Ref. A07799) and the IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800), respectively. All acquired events are represented. 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).

Case No. 1 (4 histograms): B-Chronic Lymphocytic Leukemia
Peripheral whole blood sample. Region A defines the gating strategy (CD45 positive cluster) used on this example.



Case No. 2 (4 histograms): B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia
Bone marrow aspirate. Region A defines the blast gating strategy (CD45 dim and negative cluster) used on this example.



REFERENCES

1. Borowitz, M.J., Guenther, K.L., Shults, K.E., Stelzer, G.T., "Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis", 1993, Am. J. Clin. Pathol., 100, 534-540.
2. Seltzer, G.T., Shults, K.E., Loken, M.R., "CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens", 1993, Acad. Sciences, 265-280.
3. Jennings, C.D., Foon, K.A., "Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy", 1997, Blood, 90, 2863-2892.
4. Uckun, F.M., "Regulation of human B-cell ontogeny", 1990, Blood, 76, 1908-1923.
5. 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.
6. 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.
7. "CD Guide " Compiled by the organizing committee, 1989, Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 1078.
8. "Listing of all Fourth Workshop antibodies", 1989, Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 1094-1110.
9. Slaper-Cortenbach, I.C.M., Admiraal, L.G., von dem Borne, A.E.G.Kr., van Leeuwen, E.F., Tetteroo, A.T., "Epitope specificity and complement-binding studies with monoclonal antibodies (CD9,10,24) useful for purging autologous bone-marrow grafts of cALL patients", 1987, Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens, McMichael A.J., et al., Eds., Oxford University Press, 480-484.
10. Shipp, M.A., Look, T., "Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key!", 1993, Blood, 82, 1052-1070.
11. Lebien, T.W., McCormack, R.T., "The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10) - Emancipation from a functional enigma", 1989, Blood, 73, 625-635.
12. Del Guercio, P., "The CD4 molecule, the human immunodeficiency virus and anti-idiotypic antibodies", 1987, Immunol. Today, 7, 8, 204.
13. Weiss, L.M., Arber, D.A., Chang, K.L., "CD45: a review", 1993, Appl. Immunohistochem., 1, 166-181.
14. Sewell, W.A., Cooley, M.A., Hegen, M., "CD45 Workshop Panel Report", 1997, Leucocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens. Kishimoto, T., et al, Eds., Garland Publishing, Inc., 499-502.
15. Poppema, S., Lai, R., Visser, L., Yan, X.J., "CD45 (Leucocyte Common Antigen) expression in T and B lymphocyte subsets", 1996, Leuk. Lymphoma, 20, 217-222.
16. 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.