

**IOTest
CD45-FITC
CD14-PE**

REF A07738

50 tests; 1 mL
20 µL / test



**IOTest
Конъюгированное антитело**



РУССКИЙ	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2
Специфичность	CD45	CD14
Клон	Immu19.2	RMO52
Гибридома	P3-X63-Ag. 8.653 x balb/c	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	EBV-трансформированная линия клеток FU7.57	Изолированные моноциты человека
Иммуноглобулин	IgG1	IgG2a
Вид	Мышь	
Источник	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, лтивированных in vitro	
Очистка	Аффинная хроматография	
Флуорохром	Флуоресцеин-изоцианат (ФИТЦ)	R-фикоэритрин (ФЭ)
Молярная концентрация	FITC / Ig: 3.5 - 4.5	PE / Ig: 0.5 - 1.5
λ возбуждения	488 nm	488 nm
Пик эмиссии	525 nm	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN ₃	

ПРИМЕНЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антигены CD14 и CD45, и подсчитывать их количество в биологических образцах человека с помощью проточной цитометрии.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр измеряет рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет устанавливать границы целевой популяции клеток внутри электронного окна, задаваемого на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с рассеиванием света под малым углом (прямое рассеивание - Forward Scatter или FS). На этапе гейтинга можно воспользоваться и другими гистограммами, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром, в зависимости от приложения, избранного пользователем.

Флуоресценция ограниченной популяции клеток анализируется, чтобы отличить положительно окрашенные события от неокрашенных. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Данная комбинация конъюгированных антител IOTest делает возможными идентификацию и подсчет лейкоцитов и лимфоцитов в таких биологических образцах человека, как периферическая кровь, костный мозг или бронхоальвеолярный лаваж. Двойное окрашивание CD45 / CD14 позволяет с помощью двухпараметрической гистограммы, соотносящей интенсивности флуоресценции двух использованных красителей на этапе электронного «окна», отличить CD45⁺ CD14⁻ лимфоциты от CD45⁺ CD14⁺ моноцитов, а также количественно оценить возможную контаминацию популяции лимфоцитов эритроцитами и обломками CD45⁺ CD14⁻ клеток (1). Комбинация антител к CD45 / CD14 может помочь в выявлении аномального количества лейкоцитов, экспрессирующих оба антигена, при злокачественных дискразиях крови.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Жидкие конъюгаты до и после вскрытия флакона следует хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

Стабильность в невскрытом флаконе: см. срок годности на флаконе.

Стабильность после вскрытия флакона: реактив сохраняет стабильность в течение 90 дней.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest реагент.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

В случае серьезного повреждения упаковки, или в случае несоответствия полученных результатов аналитическим характеристикам обратитесь, пожалуйста, к нашим специалистам:

e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Минимизируйте воздействие света.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN₃), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза. Кроме того, в кислой среде из азид натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азид натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.
7. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и принимать соответствующие меры предосторожности (работать в защитных перчатках, халатах и очках).
8. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки и глаза.
9. Для удаления в отходы пробирок из-под образцов крови, а также одноразовых материалов, использованных при обработке образцов, их помещают в специальные контейнеры и направляют на сжигание.

ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Образцы следует хранить при комнатной температуре (18 – 25°C), не встряхивая. Перед

забором аликвоты для исследования образец следует перемешать путем легкого встряхивания пробирки, чтобы обеспечить однородное распределение клеток по объему. Образцы подлежат анализу в течение 24 часов после венопункции.

МЕТОДИКА

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Мышь Изотипический контроль двухцветный реактив. IgG1-FITC/IgG2a-PE.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРИМЕЧАНИЕ : Описанная ниже процедура действительна для стандартных приложений. Для ряда приложений Beckman Coulter объемы образца и реактива VersaLyse могут различаться. В таких случаях необходимо следовать инструкциям, приведенным в описании приложения.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем.

1. В каждую тест-пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest, а в каждую контрольную пробирку – по 20 мкл изотипического контроля.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем производят лизис эритроцитов, при необходимости пользуясь рекомендациями по использованию реактива для лизиса.

Например, если используется VersaLyse (Ref. A09777), следует обратиться к листку-вкладышу и рекомендуется воспользоваться процедурой «с одновременной фиксацией», которая состоит в добавлении 1 мл смеси «Fix-and-Lyse» приготовляемой *ex tempore*. Немедленно встряхивают на Vortex в течение одной секунды, а затем инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Если образец не содержит эритроцитов, добавляют 2 мл ФСБ.

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспенсируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспенсируют осадок клеток, используя для этого:
 - 0,5 мл или 1 мл ФСБ, содержащего 0,1% формальдегида, если препараты предполагается хранить в течение 2 – 24 часов. (ФСБ, содержащий 0,1% формальдегида, можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800), имеющего концентрацию 10X, в 1 мл ФСБ.)
 - 0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ : Во всех случаях препараты следует хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

ПАРАМЕТРЫ

Данные о работе системы получены с применением описанной выше процедуры на образцах крови, собранных за 24 часа до исследования в стерильные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. Анализ выполнен не позднее чем через 2 часа после иммунного окрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Представители семейства трансмембранных гликопротеидов CD45, экспрессируемых на поверхности всех лейкоцитов человека, не обнаруживаются на зрелых эритроцитах. Моноклональное антитело (мАт) Immu19.2 взаимодействует со всеми изоформами молекулы CD45 (180 - 220 кДа) и поэтому считается панлейкоцитарным маркером.

Специфичность мАт Immu19.2 в отношении CD45 была установлена VI Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Кобэ, Япония (код WS: N-L103, раздел Non-Lineage NL6) (2).

Антиген CD14 обнаруживается на клетках миело-моноцитарного происхождения и очень слабо экспрессируется В-лимфоцитами. Его нет на Т-лимфоцитах, НК-клетках, эритроцитах и тромбоцитах (3, 4).

Специфичность мАт RMO52 в отношении CD14 была установлена VI Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Кобэ, Япония (код WS: MA62, раздел M) (5).

ЛИНЕЙНОСТЬ

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (THP1 activated) и клетки отрицательной линии (FRN 17.4.14.33) смешали в различных пропорциях так, чтобы все полученные смеси содержали одно и то же конечное число клеток, а отношение числа положительных клеток к числу отрицательных клеток находилось в диапазоне от 0 до 100%.

Аликвоты окрашивали в соответствии с вышеописанной процедурой, и вычисляли параметры линейной регрессии между ожидаемыми и наблюдаемыми значениями.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R ²)
CD45	$Y = 1,00 X + 0,50$	0,999
CD14	$Y = 1,00 X + 0,31$	0,999

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждой лаборатории необходимо набрать массив справочных значений путем исследования здоровых доноров из числа местного населения. Это следует делать с учетом возраста, пола, этнической принадлежности, а также любых иных местных отличий.

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Число	Средняя величина (%)	SD	CV (%)
CD45 ⁺	50	95,4	3,2	3

Моноциты	Число	Средняя величина (%)	SD	CV (%)
CD45 ⁺	50	95,9	4,0	4
CD14 ⁺	50	91,0	6,3	7

Гранулоциты	Число	Средняя величина (%)	SD	CV (%)
CD45 ⁺	50	98,5	2,2	2
CD14 ⁺	50	98,5	2,2	2

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений процентного содержания окрашенных клеток в целевой популяции. Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Число	Средняя величина (%)	SD	CV (%)
Лимфоциты CD45 ⁺	12	97,9	0,36	0,4
Моноциты CD14 ⁺	12	97,7	0,38	0,4

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Предпочтительно использовать метод лизиса эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реактив не оптимизирован для методов лизиса без отмывки.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированное антитело в составе данного реактива откалибровано таким образом, чтобы обеспечить наилучшее отношение специфического сигнала к неспецифическому. Поэтому важно, чтобы соотношение объемов реактива и образца при каждом определении было одним и тем же.
5. В случае лейкоцитоза кровь следует разводить ФСБ приблизительно до концентрации 5×10^9 лейкоцитов в 1 л.
6. При таких заболеваниях, как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатия, лизис эритроцитов может идти медленно и быть неполным или даже невозможным. В этом случае рекомендуется выделять мононуклеарные клетки с использованием градиента плотности (например, Ficoll), а затем окрашивать их.
7. Описано отсутствие окрашивания на CD45 или чрезвычайно слабое окрашивание при остром лимфобластном лейкозе. В таких случаях принадлежность blastов к лимфоидному ряду следует подтверждать с помощью других маркеров.

РАЗНОЕ

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

ТОРГОВЫЕ МАРКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER, EPICS, Flow-Set, IOTest, System II, VersaLyse и XL являются товарными знаками Beckman Coulter; логотип Beckman Coulter, IOTest и VersaLyse зарегистрированы в USPTO и SIPO.

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.

© 2012 Beckman Coulter, Inc.
 Все права защищены.



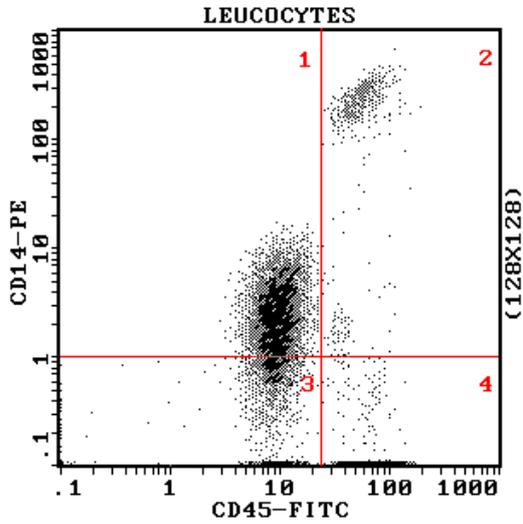
APPENDIX TO REF A07738

EXAMPLES

The graph below is a biparametric representation (Fluorescence Intensity vs. Fluorescence Intensity) of lyzed normal whole blood sample.

Staining is with IOTest CD45-FITC / CD14-PE Conjugated Antibodies (Ref. A07738). All leucocytes are shown.

Acquisition and analysis are performed with a COULTER EPICS XL flow cytometer equipped with System II software.



REFERENCES

1. Nicholson, J.K.A., Hearn, T.L., Cross, G.D., White, M.D., "1997 revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV)", 1997, MMWR 46, RR-21-29.
2. Sewell, W.A., Cooley, M.A., Katz, K.S., "CD45 Workshop panel report", 1997, Leucocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens. Kishimoto, T., et al, Eds., Garland Publishing, Inc., 499-502.
3. Todd III, R.F., Nadler, L.M., Schlossman, S.F., "Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies", 1981, J. Immunol., 4, 126, 1435-1442.
4. Todd, R.F., van Agthoven, A., Schlossmann, S.F., Terhorst, C., "Structural analysis of differentiation antigens Mo1 and Mo2 on human monocytes", 1982, Hybridoma, 3, 1, 329-337.
5. Goyert, S.M., Cohen, L., Gangloff, S.C., Ashmun, R., Haeffner-Cavaillon, N., "CD14 Workshop panel report", 1997, Leucocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens. Kishimoto, T., et al, Eds., Garland Publishing, Inc., 963-965.