

**IOTest 3
CD20-FITC /
CD10-PE /
CD19-ECD**

REF A07708

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение



**IOTest 3
Конъюгированное антитело**

IVD



РУССКИЙ	Спецификации первого компонента	Спецификации второго компонента	Спецификации третьего компонента
Специфичность	CD20	CD10	CD19
Клон	B9E9 (HRC20)	ALB1	J3-119
Гибридома	P3-X63-Ag.8.653 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	В-клетки	Лейкозные клетки человека	Клетки лимфомы SKLY18
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	Ионнообменная хроматография или аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	R Фикоэритрин (PE)	R Фикоэритрин-Техасский красный-X (ECD)
Молярная концентрация	4,5 - 6	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 CD20, CD10 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 эритроциты удаляются лизированием. 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

Одновременный анализ антигенов CD20, CD10 и CD19 полезен в дифференциальной диагностике различных В-клеточных новообразований (1), таких как В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ОЛЛ) и лимфома из малых лимфоцитов, характеризующихся фенотипом CD20⁺CD10⁻, и фолликулярная лимфома, которая имеет фенотип CD20⁺CD10⁺ (2, 3). Использование такой комбинации антител позволяет отличить В-клеточный острый

лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ) и пре-В-клеточный вариант ОЛЛ, которые характеризуются фенотипом CD20⁺CD10⁺, от пролимфоцитарного лейкоза с фенотипом CD20⁺CD10⁻ (1). В-клеточные ОЛЛ можно разделить на 2 подгруппы: В-ОЛЛ CD10⁺ и В-ОЛЛ CD10⁻, при этом первая группа характеризуется более благоприятным прогнозом (2). Примерно 60% ОЛЛ у детей характеризуются транслокацией 11q23 и имеют фенотип CD10⁻ (лейкоз из В-клеток-предшественников и пре-В-клеток) (2). Наконец, по разнице в экспрессии маркера CD20 можно дифференцировать гематопоны (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 для анализа следует использовать двухпараметрическую гистограмму CD20-FITC против CD19-ECD (2).

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 (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 азиды натрия в металлических трубах и предотвратит 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 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 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 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 × g при комнатной температуре.
6. Удалите супернатант аспирацией.
7. Ресуспенсируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.
9. Удалите супернатант аспирацией и ресуспенсируйте 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 пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C в защищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

На пятой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (5th HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1993 г., было подтверждено, что моноклональные антитела B9E9 (HRC20) направлены против CD20 (WS Code: CD20.12, Section B) (4).

Моноклональные антитела ALB1 распознают молекулу CD10 (5). 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 (6, 7).

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)
CD20	Y = 0,98 X + 0,26	0,999
CD10	Y = 0,99 X + 0,05	0,999
CD19	Y = 0,98 X + 0,14	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 лейкоцитов у этих 50 доноров:

Лимфоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD20 ⁺	50	7,37	3,17	43
CD10 ⁺	50	1,5	2,14	143
CD19 ⁺	50	7,38	3,16	43

Моноциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD10 ⁺	50	3,86	2,15	56

Гранулоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD10 ⁺	50	95,31	3,56	3,73

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание окрашенных клеток целевой популяции (клеточной линии RAMOS человека). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Клеточная линия RAMOS	Кол-во измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD20 ⁺	12	99,78	0,19	0,19
CD10 ⁺	12	99,96	0,08	0,08
CD19 ⁺	12	99,64	0,28	0,28

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 × 10⁹ 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 моноклеарные 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, 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.



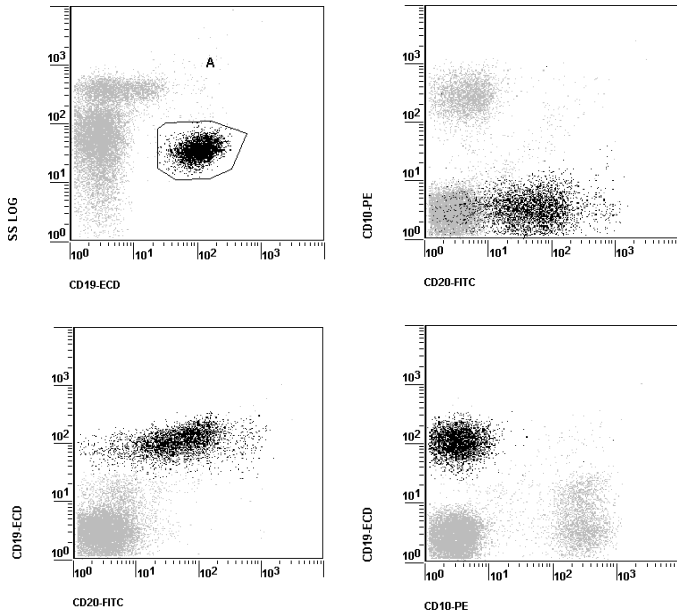
APPENDIX TO REF A07708

EXAMPLES

The 8 diagrams below are biparametric representations (Side Scatter *versus* Fluorescence Intensity or Fluorescence Intensity *versus* Fluorescence Intensity) of two specimens stained with CD20-FITC / CD10-PE / CD19-ECD Conjugated Antibodies (Ref. A07708). Lysis and fixation are with IOTest 3 Lysing Solution (Ref. A07799) and IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) respectively. All events acquired are shown. 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).

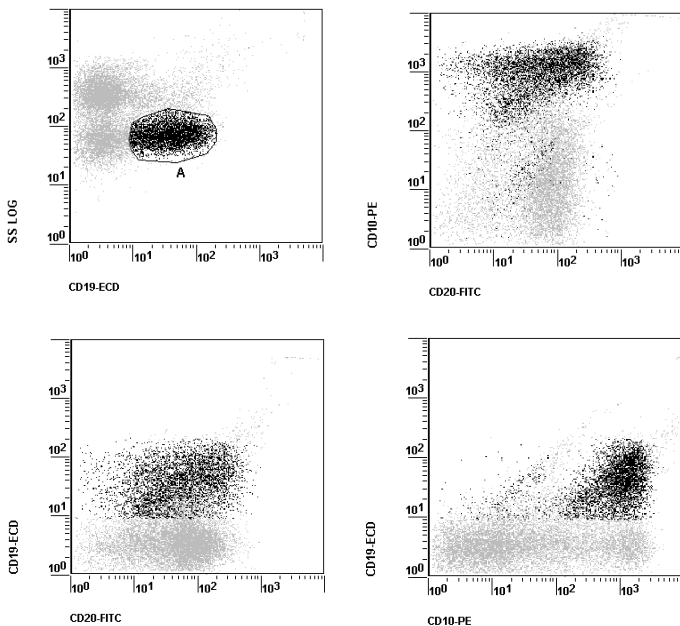
Case No. 1 (4 histograms): B-Chronic Lymphocytic Leukemia

Peripheral blood. Region A defines the gating strategy (CD19-positive cluster of blasts) used on this example.



Case No. 2 (4 histograms): B- Acute Lymphoblastic Leukemia

Bone marrow aspirate. Region A defines the blast gating strategy (CD19 positive cluster) used on this example.



REFERENCES

1. Braylan, R C., Orfao, A., Borowitz, M J., Davis, B H., "Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting" 2001, Cytometry, 46, 23-27.
2. Jennings, C.D., Foon, K.A., "Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy", 1997, Blood, 90, 2863-2892.
3. Rosenberg, S.A., "Classification of lymphoid neoplasms", 1994, Blood, 84, 1359-1360.
4. Zhou, L.J., Tedder, T.F., "CD20 Workshop panel report", 1995, Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens. Schlossman, S.F., et al., Eds., Oxford University Press, 511-514.
5. Del Guercio, P., "The CD4 molecule, the human immunodeficiency virus and anti-idiotypic antibodies", 1987, Immunol. Today, 8, 204.
6. "CD Guide " Compiled by the organizing committee, 1989, Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 1078.
7. "Listing of all Fourth Workshop antibodies", 1989, Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 1094-1110.